

Metabolische Oszillationen in Hefe

Optimalität und Koordination

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biophysik

eingereicht an der

Lebenswissenschaftlichen Fakultät

Humboldt-Universität zu Berlin

von

M.Sc. Willi Gottstein

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät:

Prof. Dr. Richard Lucius

Gutachter:

1. Prof. Dr. Hanspeter Herzel

2. Dr. Ralf Steuer

3. Dr. Oliver Ebenhöf

Tag der mündlichen Prüfung: 11.12.2014

Zusammenfassung

Wenn Hefe in einer kontinuierlichen Kultur wächst, kommt es zu einer spontanen Synchronisation der Zellen resultierend in einer stabilen respiratorischen Oszillation. Sowohl weite Teile des Transkriptoms als auch des Metaboloms oszillieren in klaren Phasenbeziehungen zu dieser sich ändernden respiratorischen Aktivität. In dieser Arbeit wird dieses Phänomen sowohl von theoretischer als auch experimenteller Seite untersucht.

Es wird ein Markierungsexperiment mit ^{13}C -markierter Glucose durchgeführt, das die Grundlage der Bestimmung zeitaufgelöster Flussdaten darstellt. Es kann gezeigt werden, dass die Konzentration eines Intermediates eines in den Lipidabbau involvieren Stoffwechselweges sich in einer festen Phasenbeziehung zur respiratorischen Aktivität ändert. Auf diesem Befund aufbauend wird die Dynamik des Lipidoms untersucht und zum ersten Mal gezeigt, dass dieses ebenfalls oszillatorisches Verhalten aufweist. Dabei gibt es eine Gruppe an Lipiden, die ihre maximalen Konzentrationen in der Phase hoher Sauerstoffaufnahme zeigt und eine andere Gruppe, für die dies in der Phase niedriger Sauerstoffaufnahme zutrifft. Da Lipide sowohl in den Energiestoffwechsel involviert als auch für Strukturgebung vonnöten sind, könnte es sich hierbei um ein Umschalten von energiebereitstellenden zu strukturgebenden Prozessen handeln.

Da die Frage nach der Ursache der Oszillationen noch nicht geklärt ist, werden vier Szenarien betrachtet, die in biochemischen Netzwerken zu Oszillationen führen können. Es wäre möglich, dass es sich um einen rein mechanistischen Effekt ohne eine unmittelbare Funktion - beruhend auf einer negativen Rückkopplung und einer intrinsischen Zeitverzögerung - handelt. Weiterhin könnten diese Oszillationen die sich ändernden physiologischen Anforderungen eines Prozesses, der in einer gegebenen Ordnung abzulaufen hat, widerspiegeln. Unter Verwendung von generischen Minimalsystemen und *in-silico* Evolution wird gezeigt, dass Oszillationen auch zu einem Fitnessvorteil für die Einzelzelle führen können. Dieser beruht zum einen darauf, dass Oszillationen eine zeitliche Trennung der Produktion toxischer Nebenprodukte von der Produktion der durch sie geschädigten Komponenten ermöglicht. Zum anderen erlaubt oszillatorisches Verhalten das Ablaufen von Reaktionen in dem für sie jeweils günstigsten Reaktionsmilieu.

Basierend auf den experimentell bestimmten Austauschraten für Glucose, Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid wird mittels Flussbilanzanalyse untersucht, wie sich die optimalen Syntheseraten von Biomasse und die Vorläufer selbiger über den Zyklus hinweg ändern. Die Ergebnisse deuten auf eine Trennung von Biosynthese und Stressantwort hin, was eine mögliche Funktion dieser Zyklen darstellen könnte.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen und Notation	vii
1 Einleitung	1
1.1 Metabolische Zyklen in Hefe - ein Überblick	1
1.2 Ziele und Aufbau der Arbeit	8
2 Charakterisierung der metabolischen Zyklen in Hefe: eine experimentelle Annäherung	9
2.1 Experiment zur metabolischen Flussanalyse mittels ^{13}C -markierter Glucose	9
2.1.1 Methoden	10
2.1.2 Vorläufige Ergebnisse	14
2.2 Die Dynamik des Lipidoms	16
2.2.1 Durchführung des Experiments, Extraktion der Metabolite	16
2.2.2 Auswertung und Resultate	17
2.3 Zusammenfassung und weiterführende Studien	19
3 Ursprung von Oszillationen in biochemischen Netzwerken	21
3.1 Oszillationen als intrinsische Netzwerkeigenschaft	21
3.2 Oszillationen beruhend auf einer intrinsischen Ordnung	22
3.3 Oszillationen als Antwort auf toxische Nebenprodukte	24
3.3.1 Minimalsystem zur Untersuchung von Strategien zur Biomasseproduktion in Anwesenheit toxischer Nebenprodukte	24
3.3.2 <i>In-silico</i> Evolution - genereller Ablauf	25
3.3.3 Ergebnisse	26
3.3.4 Fazit	28
3.4 Oszillationen stellen ein optimales Reaktionsmilieu ein	33
3.4.1 Maximierung der Wachstumsrate	33
3.4.2 Minimierung des Enzymbedarfs	38
3.4.3 Fazit	41
3.5 Zusammenfassung und weiterführende Arbeiten	42
4 Flussbilanzanalyse zu metabolischen Zyklen in Hefe	45
4.1 Grundlagen der Flussbilanzanalyse	45
4.2 Verwendetes Modell	47
4.3 Verwendete Software	48
4.4 Berechnung der Austauschraten	48
4.4.1 Berechnung der Glucoseaufnahmerate	49

4.4.2	Berechnung der Sauerstoffaufnahme- und der Kohlenstoffdioxid- abgaberate	49
4.5	Wachstumsrate im Chemostat - Modell und Experiment	54
4.5.1	Zusammenhang zwischen Verdünnungsrate und Wachstumsrate im Chemostat	54
4.5.2	Wachstumsrate für gemittelte Austauschraten	55
4.5.3	Abhängigkeit der Wachstumsrate von dynamischen Austauschflüs- sen über einen Zyklus	59
4.5.4	Maximierung der ATP- und NADPH-Produktion in Abhängigkeit der Austauschraten	70
4.6	Maximierung von Produktionsraten einzelner Biomassekomponenten . .	77
4.6.1	Produktionsraten einzelner Biomassekomponenten in Abhängig- keit der Austauschraten	79
4.6.2	Zeitliche Ordnung in der Biosynthese von Biomassekomponenten?	86
4.7	Zusammenfassung und weiterführende Arbeiten	87
5	Zusammenfassung und Ausblick	91
A	Ergänzendes Material zu Kapitel 2	95
A.1	Mediumzusammensetzung	95
A.2	Datenverarbeitung mit MZmine 2.10	95
B	Ergänzendes Material zu Kapitel 3	99
B.1	Ergänzendes Material zu Abschnitt 3.3	99
B.1.1	Verwendete Gleichungen	99
B.1.2	<i>In-silico</i> Evolution - konkreter Ablauf	100
B.1.3	Zeitreihen ohne Regulation	102
B.2	Ergänzende Gleichungen zu Abschnitt 3.4.1	104
B.3	Minimierung des Enzymbedarfs in Abschnitt 3.4.2	106
B.4	Gleichungen für Minimalmodell	110
C	Ergänzendes Material zu Kapitel 4	115
	Literaturverzeichnis	119
	Abbildungsverzeichnis	131
	Tabellenverzeichnis	133
	Danksagung	135

Abkürzungen und Notation

13DGlc	$\beta(1, 3)$ -D-Glucan
Acald	Acetaldehyd
ACCOA	Acetyl-Coenzym A
ADP	Adenosindiphosphat
AKG	alpha-Ketoglutarat
Ala	L-Alanin
AMP	Adenosinmonophosphat
Arg	L-Arginin
Asn	L-Asparagin
Asp	L-Asparat
ATP	Adenosintriphosphat
[a.u.]	beliebige Einheiten
Cbp	Carbamoylphosphat
CE-MS	Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie
CIT	Citrat
CMP	Cytidinmonophosphat
Cys	L-Cystein
dCMP	Desoxycytidinmonophosphat
dGMP	Desoxyguanosindiphosphat
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dTMP	Desoxythymidinphosphat
Ergst	Ergosterol
EtOH	Ethanol
F6P	Fructose-6-Phosphat
G3P	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
G6P	Glucose-6-Phosphat
Gln	L-Glutamin
Glu	L-Glutamat
Gly	Glycin
Glyc	Glykogen
GMP	Guanosinmonophosphat
Hcyt	Protonen der Atmungskette
His	L-Histidin
Ile	L-Isoleucin
Leu	L-Leucin
LC-MS	Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie
Lys	L-Lysin

Abkürzungen und Notation

MAL Malat

Met L-Methionin

MS/MS Tandem-Massenspektrometrie

M_xtr "virtueller Transportrate" für Metabolit x

m/z Mass-zu-Ladungs-Verhältnis

NAD/NADH oxidierte/reduzierte Form von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid

NADP/NADPH oxidierte/reduzierte Form von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat

OAA Oxalacetat

Pa Phosphatidat

Pc Phosphatidylcholin

Pe Phosphatidylethanolamin

PEP Phosphoenolpyruvat

Phe L-Phenylalanin

Pro L-Prolin

Ps phosphatidylserin

Ptd1ino Phosphatidylinositol

Pyr Pyruvat

qATPS basaler Verbrauch an *ATP*

qCO₂ Kohlenstoffdioxidabgaberate

qGlc Glucoseaufnahmerate

qNADPHS basaler Verbrauch an *NADPH*

qO₂ Sauerstoffaufnahmerate

ROS reaktive Sauerstoffspezies

RT Retentionszeit ("retention time")

Ser L-Serin

SUCC Succinat

SUCCOA Succinat-Coenzym A

t Zeit

T Zeitintervall

Thr L-Threonin

Triglyc Triglycerid

Trp L-Tryptophan

Tyr L-Tyrosin

UMP Uridinmonophosphat

Val L-Valin

Zymst Zymosterol

1 Einleitung

1.1 Metabolische Zyklen in Hefe - ein Überblick

Der Gegenstand dieser Arbeit ist ein oszillatorisches Phänomen, das in Kulturen von Sprosshefe beobachtbar ist. Lässt man Hefe in einer kontinuierlichen Kultur wachsen, kommt es zu einer Synchronisation der Zellen, die sich in einer stabilen respiratorischen Oszillation ausdrückt und meist über die Konzentration an gelöstem Sauerstoff im Medium visualisiert wird (Abbildung 1.1). Die Phase, die mit einer hohen Sauerstoffaufnahme assoziiert ist, wird dabei nachfolgend als die *oxidative Phase* und die Phase, in der die Sauerstoffaufnahme gering ist, als *reduktive Phase* bezeichnet. Mit diesen respiratorischen Oszillationen gehen auch Oszillationen des Großteils des Metaboloms und des Transkriptoms einher, die sich in klaren Phasenbeziehungen zu der respiratorischen Aktivität befinden. Die Periodendauer der Oszillationen ist vom Stamm sowie den Kulturbedingungen abhängig und liegt zwischen zirka 40 Minuten und mehreren Stunden. Stabile Oszillationen in Hefekulturen sind schon seit mehreren Jahrzehnten bekannt. Im Laufe der Jahre kamen immer neue Facetten hinzu, die im folgenden chronologisch wiedergegeben sind, da sie wesentliche Teile der Arbeit beeinflussen und motivieren.

Eine kurze Geschichte der Oszillationen in Hefe

1954 wurde das Verhalten einer Hefekultur im Chemostat erstmals näher analysiert und beschrieben [22]. Gefunden wurde dabei eine Oszillation der optischen Dichte, die ein Maß für das Wachstum der Population darstellt, die um 90 Grad gegenüber der Oszillation des pH-Werts im Medium verschoben ist. Zurückgeführt wird diese Beobachtung auf einen systeminherenten Rückkopplungsmechanismus: Das Wachstum der Population geht mit einer Freisetzung von Säure einher, was sowohl den pH-Wert senkt, als auch die Wachstumsrate verringert. Mit Verringerung der Wachstumsrate sinkt auch die Freisetzung von Säure, was die Wachstumsrate wieder ansteigen lässt. Basierend auf dieser experimentellen Arbeit erscheint im selben Jahr in derselben Gruppe ein kurzer Artikel, der sich mit der Analogie zwischen Kontrollsystemen mit Rückkopplung und biologischen Systemen befasst [21]. Es wird gesagt, dass man keine komplizierten Gleichungen benötigt, um derartiges periodisches Verhalten mathematisch zu beschreiben. Lineare Reaktionskinetiken seien ausreichend, gegeben eine Netzwerktopologie, die eine negative Rückkopplung und eine metabolische Verzögerung dieses Signals erlaubt.

1969 wird der Energiehaushalt von Hefekulturen im Chemostat erstmals detail-

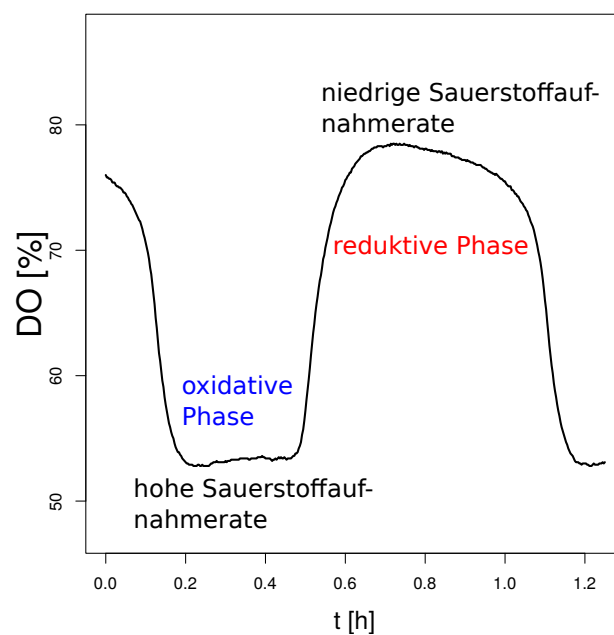


Abbildung 1.1: Visualisierung der respiratorischen Oszillation anhand des gelösten Sauerstoffs im Medium. Die Phase, in der die Sauerstoffaufnahme hoch und die Konzentration des gelösten Sauerstoffs im Medium niedrig ist, heißt oxidative Phase. Die Phase, in der eine geringe Sauerstoffaufnahme und eine hohe Konzentration an gelöstem Sauerstoff im Medium zu verzeichnen ist, heißt reduktive Phase.

1.1 Metabolische Zyklen in Hefe - ein Überblick

liert untersucht [50]. Es wird festgestellt, dass der Gasaustausch, Sauerstoffaufnahme und Kohlenstoffdioxidproduktionsrate, davon abhängt, wo sich die Zellen im Sprossungszyklus befinden. Erhöhter Gasmetabolismus und damit einhergehend höhere Energieproduktion fallen dabei mit der Initiierung der Sprossung zusammen. Es wird behauptet, dass die Zellen zunächst Reserven akkumulieren, um sie dann mit Beginn der Sprossung wieder zu verbrauchen, was auf der Beobachtung basiert, dass sich das Trockengewicht im Medium zunächst erhöht und mit Beginn der Sprossung abfällt. Allerdings, so der Autor, kann die Frage, ob für den Abbau der (Energie-)Reserven die Konzentrationen der Reserven, die Aktivität bestimmter Enzyme, die Konzentration bestimmter Metabolite oder aber die Initiierung der DNA-Synthese verantwortlich ist, nicht beantwortet werden. Es wird aber die Wichtigkeit einer zeitlich gut abgestimmten Energieproduktion über den Zellzyklus für die Einzelzelle betont.

In einer zeitgleich erscheinenden Veröffentlichung werden die angesprochenen Reserven der Zellen näher charakterisiert [57]. Es handelt sich um die Kohlenhydrate Trehalose und Glykogen, die akkumuliert, um dann mit Beginn der Sprossung abgebaut zu werden, um den Energiebedarf der Sprossung zu decken. Die Zeitverläufe der Sauerstoffaufnahme- und Kohlenstoffdioxidproduktionsrate finden sich im Einklang mit [50]. Gezeigt wird, wie sich die Trehalase-Aktivität - Trehalase ist das Enzym, das Trehalose zu Glucose abbaut - über den Zyklus ändert. Die Aktivität ist dann am höchsten, wenn die Degradationsrate von Trehalose ihren Maximalwert annimmt und am niedrigsten, wenn Trehalose synthetisiert wird.

In den bisherigen Arbeiten wurde meist angenommen, dass diese Oszillationen auf dem Zellzyklus beruhen. 1983 erscheint ein Modell, mit dem sich wesentliche Eigenschaften der beobachteten Oszillationen reproduzieren lassen, ohne den Zellzyklus explizit mit einzubeziehen [36]. Um sich selbsterhaltende Oszillationen zu erhalten, muss allerdings die in [57] beschriebene Trehalase mit berücksichtigt werden. Wird dasselbe Modell ohne den Kohlenhydratspeicher Trehalose untersucht, werden keine Oszillationen beobachtet.

Die Perioden bei den bisher beschriebenen Arbeiten beträgt jeweils mehrere Stunden. 1992 werden zum ersten Mal Oszillationen beschrieben, deren Perioden 40 bis 50 Minuten betragen, die damit weiter unter den bisher beschriebenen liegen [97]. Neben dem gelösten Sauerstoff im Medium, den Respirationsraten, der Ethanol- und Acetatproduktionsrate weisen sowohl *ATP*- und als auch *NADH*-Konzentrationen innerhalb der Zellen oszillatorisches Verhalten auf.

Unterschieden werden zwei Phasen: Wenn Glykogen abgebaut wird, lässt sich eine verminderte respiratorische Aktivität und eine einsetzende Ethanolproduktion verzeichnen. In dieser Phase erreicht der pH-Wert sein Minimum, wie auch die intrazellulären Level von Acetat und Pyruvat, während die *ATP*-Konzentration ihren Maximalwert erreicht. Wenn Glykogen hingegen aufgebaut wird, ist der pH-Wert maximal, die *ATP*-Konzentration minimal und Pyruvatkonzentration wie auch Acetatkonzentration erreichen ihre Maximalwerte und es ist eine hohe respiratorische Aktivität festzustellen.

1 Einleitung

Es wird behauptet, dass diese Oszillationen nicht mit dem einer Synchronisation des Zellzyklus zusammenhängen. Vielmehr wird darüber spekuliert, dass der Grund für die Oszillationen in den Änderungen des intrazellulären pH-Wertes zu suchen sei, was eine Änderung des Glykogenstoffwechsels bewirkt, die wiederum den glykolytischen Fluss ändert. Entscheidend für diese Regulation könnte die Konzentration von cAMP sein, die vom pH-Wert abhängt, aber nicht gemessen wurde.

Vier Jahre später, 1996, führt dieselbe Gruppe vergleichbare Experimente mit Ethanol statt Glucose als Kohlenstoffquelle durch [51]. Auch dann lässt sich ein Oszillieren der besagten physiologischen Parameter beobachten; die Periode beträgt ebenfalls ungefähr 40 Minuten. Interessanterweise sind Sauerstoffaufnahme und die Oszillation des intrazellulären pH-Wert phasenversetzt; wenn Glucose die Kohlenstoffquelle ist, sind sie hingegen in Phase. Da die Beobachtungen ansonsten sehr ähnlich zu denen sind, wenn Glucose die Kohlenstoffquelle darstellt, wird die zuvor geäußerte Idee [97], dass die Oszillationen auf Flussänderungen der Glykolyse - hervorgerufen durch Änderungen des intrazellulären pH-Wertes - zurückzuführen sind, verworfen.

Im Jahre 2003 kann erstmals gezeigt werden, dass cAMP unmittelbar vor dem Beginn des Abbaus von Trehalose und Glykogen seinen Höchstwert erreicht, woran sich die Sprossung anschließt [76]. Diese Beobachtung deckt sich mit den in [97] geäußerten Spekulationen.

Im selben Jahr wird die Konzentrationen von Aminosäuren über den Zyklus hinweg gemessen [33]. Es kann gezeigt werden, dass die Konzentrationen von bestimmten Aminosäuren oszillatorisches Verhalten aufweisen; bei anderen Aminosäuren bleibt die Konzentration annähernd konstant, bei einer dritten Gruppe werden die Dynamiken als chaotisch bezeichnet. Die Periode der oszillierenden Aminosäuren ist dabei gleich der anderer wichtigen Größen, wie der Kohlenstoffdioxidabgaberate, der extrazellulären Acetat- und Pyruvatkonzentration, was nahelegt, dass es eine direkte Verbindung zwischen den respiratorischen und den Oszillationen der Aminosäurekonzentrationen gibt. Weiterhin gibt es einen klaren Zusammenhang zwischen der Periode der Aminosäuren und der Generationszeit, was den Schluss nahelegt, dass diese Oszillationen mit dem Zellzyklus assoziiert sind [33].

In 2004 wird zum ersten Mal gezeigt, dass mit diesen respiratorischen Oszillationen auch eine genomweite Oszillation des Transkriptoms einhergeht [54]. Es gibt dabei drei Hauptcluster zu verzeichnen, wobei zwei in der reduktiven Phase ihre maximale Expression zu verzeichnen haben und eines in der oxidativen, die sich auch funktional Respirations- beziehungsweise Reduktionsprozessen zuordnen lassen. Die Periode beträgt ungefähr 40 Minuten, was weit unterhalb der Generationszeit liegt. In [97] wurde gesagt, dass diese kurzperiodischen Oszillationen nicht mit dem Zellzyklus assoziiert seien. Hier wird allerdings festgestellt, dass DNA-Replikation in einem bestimmten Zeitfenster stattfindet, nämlich dann, wenn die Sauerstoffaufnahme gering ist. Es wird darüber spekuliert, dass dies einen evolutionären Vorteil darstellt, da somit die

1.1 Metabolische Zyklen in Hefe - ein Überblick

Schädigung von DNA durch toxische Nebenprodukte der Respiration eingeschränkt werden kann.

In 2005 erscheint eine ganz ähnliche Arbeit [117]. Die Periode beträgt hierbei allerdings 4 bis 5 Stunden statt 40 Minuten. Auch hier wird festgestellt, dass die Replikation von DNA in der reduktiven Phase stattfindet und gesagt, dass dies dazu dienen könne, den Schaden durch toxische Nebenprodukte der Respiration für die DNA-Replikation zu minimieren. Weiterhin wird spekuliert, dass die Oszillationen dazu dienen anabolische und katabolische Prozesse optimal ablaufen zu lassen, da deren jeweiliges Reaktionsmilieu optimiert werden könne.

Im selben Jahr konnte gezeigt werden, dass auch zahlreiche Intermediate des zentralen Kohlenstoffstoffwechsels, der Glykolyse und des Citratzyklus, oszillieren [127]. Besonders stark ausgeprägte Oszillationen sind dabei für die Intermediate der unteren Glykolyse zu verzeichnen. Man findet zudem, dass bestimmte Aminosäuren ihre maximale Konzentration leicht phasenversetzt zu der ihres jeweiligen Vorläufers besitzen. Dass man Oszillationen von Aminosäurekonzentrationen beobachten kann, wie in [33], lässt sich demnach teilweise auf die periodische Produktion der Vorläufer zurückführen.

In 2007 erfolgt eine Veröffentlichung, in der nachgewiesen wird, dass nicht nur der zentrale Kohlenstoffstoffwechsel, sondern der Großteil des Metaboloms oszillatorisches Verhalten zeigt [77]. 70% der identifizierten Metabolite weisen dabei ihre höchste Konzentration während des Übergangs von der oxidativen zur reduktiven Phase auf, wenn auch *NAD(P)H* seine maximale Konzentration verzeichnet und die DNA-Syntheserate am höchsten ist [63]. Basierend auf den Transkriptomdaten konnte gezeigt werden, dass biosynthetische Prozesse phasenversetzt zu Prozessen ablaufen, die Atmung und Stressreaktion zuzuordnen sind.

Im selben Jahr wird der Zusammenhang zwischen DNA-Synthese und der respiratorischen Oszillation näher untersucht und man kommt zu dem Ergebnis, dass DNA-Synthese ausschließlich in der reduktiven Phase stattfindet [9]. Darüber hinaus wurde eine erhöhte Mutationsrate festgestellt, wenn die Zellen gezwungen wurden, DNA in der oxidativen Phase zu synthetisieren, was die in [54, 117] geäußerte Idee, wonach die Oszillationen dazu dienen DNA-Replikation von Respiration zeitlich zu trennen, unterstützt.

Ein Jahr später, in 2008, wird die Abhängigkeit der Genexpression von der Wachstumsrate für verschiedene limitierende Faktoren in nicht synchronen Hefekulturen im stationären Zustand bestimmt [4]. Es kann gezeigt werden, dass die Expression von 27 Prozent des Genoms mit der Wachstumsrate korreliert sind - entweder positiv oder negativ - unabhängig vom limitierenden Faktor. Die mit Wachstum positiv korrelierten Gene können dabei überwiegend der Translationsmaschinerie zugeordnet werden, was sinnvoll erscheint, da das Wachsen mit einer erhöhten Wachstumsrate auch einen erhöhten Bedarf an Proteinen mit sich bringt. Bei den Genen, die mit dem Wachstum

1 Einleitung

negativ korreliert sind, handelt es sich hauptsächlich um Gene, die mit oxidativen Energiemetabolismus - insbesondere dem, der in den Peroxisomen stattfindet - assoziiert sind. Über die biologische Interpretation wird dabei nur spekuliert: Da mit sinkender Wachstumsrate die Zeit zwischen Zellteilungen steigt, könnte es einen erhöhten Bedarf am Abbau von ROS geben, der in den Peroxisomen vonstatten geht [4].

Ob es sich bei den Oszillationen um Oszillationen auf Einzelzellebene handelt, die synchronisiert werden oder aber um einen Populationseffekt, ist eine offene Frage. 2010 wurde dieser Thematik nachgegangen und dahingehend beantwortet, dass es sich bei den Oszillationen um eine intrinsische Eigenschaft der Zellen handelt, die weder von der Synchronisation noch von der Art der Limitierung der Wachstumsrate abhängig ist, da dieses zyklische Verhalten der Genexpression auch dann beobachtet wird, wenn Einzelzellen in nicht synchronen Kulturen untersucht werden, in denen Phosphat der limitierende Faktor ist [104].

2011 wird auch - wie 2008 in [4] - die Abhängigkeit der Genexpression von der Wachstumsrate im stationären Zustand untersucht, allerdings mit Ethanol statt Glucose als Kohlenstoffquelle [105]. Damit soll unter anderem untersucht werden, inwieweit die metabolischen Zyklen, die sich in Zellen beobachten lassen, die auf Glucose [97] beziehungsweise Ethanol [51] wachsen, vergleichen lassen. Wie schon in [4] findet man, dass ungefähr 25 Prozent des Gesamtgenoms mit der Wachstumsrate korreliert sind. Weiterhin wird - unter der Einbeziehung der Daten von [4] - eine Menge an Genen identifiziert, die spezifisch für die jeweilige Kohlenstoffquelle ist. All diejenigen Gene, die unabhängig von der Kohlenstoffquelle mit der Wachstumsrate korreliert sind, werden während des metabolischen Zyklus periodisch exprimiert, wobei die Gene, die mit Wachstum positiv korreliert sind, diejenigen sind, die in der oxidativen Phase exprimiert werden, wohingegen diejenigen Gene, die mit der Wachstumsrate negativ korreliert sind, in der reduktiven exprimiert werden. Weiterhin wird gefunden, dass die S-Phase sehr wohl in der oxidativen Phase stattfinden kann, was die geäußerten Hypothesen hinsichtlich des evolutionären Ursprungs der Oszillationen [9, 54, 117] infrage stellt.

Im selben Jahr wird von derselben Gruppe der Zusammenhang zwischen dem Zellzyklus und dem metabolischen Zyklus näher untersucht, wozu eine Batch-Kultur anstelle einer kontinuierlichen gewählt wurde [106]. Die Kohlenstoffquelle ist Ethanol und die Mehrzahl an Zellen befindet sich in der G1-Phase des Zellzyklus; deren Anteil an der Population wächst während der Probenentnahme von 90% auf 99%. Dabei zeigt sich, dass der metabolische Zyklus auch in sich nicht teilenden Zellen, die sich in besagter G1-Phase des Zellzyklus befinden, zu beobachten ist. Viele der Gene, die mit dem Zellzyklus assoziiert sind, oszillieren dabei mit derselben Periode wie ebenjener metabolische Zyklus, da sie nicht nur für den Zellzyklus vonnöten sind, sondern auch für metabolische Prozesse und Wachstum. Vergleicht man die Genexpressionsdaten mit denen, die in einer kontinuierlichen Kultur gewonnen wurden, stellt man fest, dass sie in denselben Phasen ihr jeweiliges Expressionsmaximum haben.

1.1 Metabolische Zyklen in Hefe - ein Überblick

Beschrieben werden dabei drei Cluster von Genen: Die Gene im ersten Cluster sind dabei dem Zellzyklus zuzuordnen und zeigen kein zyklisches Verhalten. Im zweiten Cluster finden sich die Gene, die periodisch exprimiert werden, wobei die Periode der des metabolischen Zyklus entspricht. Im dritten Cluster finden sich diejenigen Gene, die für den Stop des Zellzyklus verantwortlich sind. Die Cluster eins und drei sind also denjenigen Zellen zuzuordnen, die sich während des Experiments teilten, während das zweite und größte Cluster Zellen zuzuordnen ist, die metabolische Zyklen durchliefen. Es gibt demnach zwei Klassen von Genen: diejenigen, die nur mit dem Zellzyklus oszillieren und diejenigen, die mit den metabolischen Zyklus assoziiert sind.

Die Datensätze von [54, 117] unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Periode, was Anlass war, die beiden Datensätze hinsichtlich der Phasenbeziehungen der jeweiligen Genexpressionsdaten zu vergleichen, was 2012 geschah [67]. Gefunden werden dabei zwei Hauptcluster, die sich in sieben Untercluster aufspalten und für anabolische Prozesse und Wachstum beziehungsweise für katabolische Prozesse und Stressreaktion verantwortlich sind, analog zu den Arbeiten von [4] und [105]. Das Verhältnis von *ATP* zu *ADP* - ein Maß für den energetischen Zustand der Zelle - oszilliert und die mit Wachstum assoziierten Gene werden exprimiert, wenn das Verhältnis groß ist, während diejenigen Gene, die mit der Stressreaktion in Zusammenhang stehen, exprimiert werden, wenn dieses Verhältnis kleine Werte annimmt.

Darauf und auf der Tatsache basierend, dass es eine direkte Rückkopplung des Energiezustandes auf die Genexpression in Bakterien gibt, wird ein ähnlicher Mechanismus hier vorgeschlagen: Basierend auf dem Energiezustand der Zelle wird entweder die Transkriptionsmaschinerie für Anabolismus oder Katabolismus aktiviert.

Eine neue Facette hinsichtlich der metabolischen Oszillationen wird mit der Arbeit von [91] im Jahre 2013 hinzugefügt. Studiert wird der Einfluss von Licht auf die metabolischen Zyklen. Es wird festgestellt, dass sichtbares Licht Auswirkungen auf die Periode und Amplitude ebenjener Oszillationen haben kann; die Periode wird kürzer und die Amplitude abgeflacht. Der größte Effekt kann dabei bei denjenigen Wellenlängen beobachtet werden, die von Cytochromen absorbiert werden, was insbesondere blaues Licht ist. Es werden zwei Mechanismen genannt, auf denen dieser Effekt beruhen kann: Zum einen könnte die Inhibierung des Elektronentransports zu einer erhöhten Produktion von ROS führen, die Proteine/Enzyme und andere Zellkomponenten schädigen könnten und zum anderen könnte die Absorption von blauem Licht durch Cytochrom den Elektronentransport in der Atmungskette und damit auch ATP-Produktion unterbinden. Während das erste Szenario als alleinige Ursache ausgeschlossen werden konnte, lassen sich für die zweite Hypothese experimentelle Hinweise finden. So führt die Zugabe von Natriumazid zu denselben Effekten, wie die Bestrahlung mit Licht. Natriumazid ist ein Inhibitor der Respiration, das an Cytochrom c bindet und selbiges inhibiert wie auch die Cytochromoxidase, beides Bestandteile der Atmungskette. Daraus wird geschlossen, dass Licht die Inhibierung von Cytochromen bewirkt, was eine Inhibierung des Elektronentransports und der oxidativen Phosphorylierung zur Folge hat. Dies bewirkt eine Änderung der Periode und der Amplitude der metabolischen

Oszillation.

1.2 Ziele und Aufbau der Arbeit

Die metabolischen Zyklen sollen sowohl experimentell als auch von theoretischer Seite näher untersucht und charakterisiert werden. Dafür werden folgende Analysen durchgeführt.

Kapitel “Charakterisierung der metabolischen Zyklen in Hefe: eine experimentelle Annäherung” Zunächst soll experimentell eine noch bessere Charakterisierung der metabolischen Zyklen ermöglicht werden. Dazu werden zwei Experimente vorgestellt, die ich am “Institute for Advanced Biosciences”, Tsuruoka, Japan in der Arbeitsgruppe von Dr. Douglas Murray durchgeführt habe. Mit dem ersten Experiment wird die Basis für eine Bestimmung zeitaufgelöster Flussdaten geschaffen, bei dem zweiten Experiment handelt es sich um die Beschreibung der Dynamik des Lipidoms.

Kapitel “Ursprung von Oszillationen in biochemischen Netzwerken” Ob die Oszillationen einen funktionalen Aspekt besitzen, ist noch ungeklärt. Daher werden im zweiten Teil der Arbeit verschiedene Szenarien aufgezeigt, die zu Oszillationen in biochemischen Netzwerken führen können. Die dort vorgenommenen Analysen beruhen ausschließlich auf Computersimulationen.

Kapitel “Flussbilanzanalyse zu metabolischen Zyklen in Hefe” Basierend auf den gemessenen Austauschraten für Glucose, Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid werden Untersuchungen mittels Flussbilanzanalyse angestellt. Diese haben das Ziel, Flussverteilungen zu bestimmen, die Rückschlüsse auf die in den einzelnen Phasen des Zyklus stattfindenden Prozesse zulassen.

Am Ende eines jeden Kapitels werden die Resultate zusammengefasst, diskutiert und weiterführende Arbeiten aufgezeigt, die auf den dargelegten Ergebnissen aufbauen.

2 Charakterisierung der metabolischen Zyklen in Hefe: eine experimentelle Annäherung

Sowohl die Probenentnahme als auch die Extraktion der Metabolite erfolgte für beide der dargelegten Experimente jeweils durch mich während meines Aufenthalts in der Arbeitsgruppe von Dr. Douglas Murray am “Institute for Advanced Biosciences”, Tsuruoka, Japan. Die Analyse der Proben mittels Massenspektrometrie erfolgte durch Kazutaka Ikeda am selben Institut. Die Auswertung der Experimente mit ^{13}C -markierter Glucose erfolgt durch Dr. Douglas Murray (Abbildung 2.3). Zeitaufgelöste Flussdaten sind bei Abschluss der Arbeit noch nicht verfügbar. Die Auswertung der Daten für die Ermittlung der Dynamik des Lipidoms erfolgt durch mich (Abbildung 2.5). Die Identifizierung der Lipide wird durch Kazutaka Ikeda vorgenommen und liegt bei Abschluss der Arbeit noch nicht vor.

Wie in Kapitel 1.1 dargestellt, handelt es sich bei den Zyklen in Hefe um Dynamiken, die auf sich auf allen physiologischen Ebenen beobachten lassen. Eine detaillierte Charakterisierung der Veränderungen des intrazellulären Metabolismus über einen Zyklus hinweg steht allerdings noch aus.

In diesem Kapitel wird zunächst ein Experiment beschrieben, das die Grundlage für eine solche Charakterisierung bildet. Es handelt sich um ein Experiment, das es erlaubt zeitaufgelöste Flussverteilungen zu ermitteln, um darüber Rückschlüsse zu gewinnen, zu welchem Zeitpunkt des Zyklus welche Stoffwechselwege aktiv sind, was Rückschlüsse über die den Dynamiken zugrunde liegenden Regulationsstrukturen zuließe.

2.1 Experiment zur metabolischen Flussanalyse mittels ^{13}C -markierter Glucose

Weite Teile des Metaboloms von Hefe in einer kontinuierlichen Kultur zeigen oszillatorisches Verhalten [77]. Metabolische Flüsse - die zeitabhängige Bewegung von Metaboliten durch das metabolische Netzwerk - lassen sich aus diesen Konzentrationsprofilen allerdings nicht ableiten, sondern müssen anderweitig bestimmt werden. Eine Standardmethode dafür stellt die ^{13}C -basierte Flussanalyse dar [98, 133]. Dabei wird eine ^{13}C -markierte Kohlenstoffquelle - in diesem Fall Glucose - zugegeben, deren Einbau nachverfolgt wird. Aus den sich dabei ergebenden Markierungsmustern können über NMR [69] oder Massenspektrometrie [53] Flussdaten ermittelt werden. Ein solches

2 Charakterisierung der metabolischen Zyklen in Hefe: eine experimentelle Annäherung

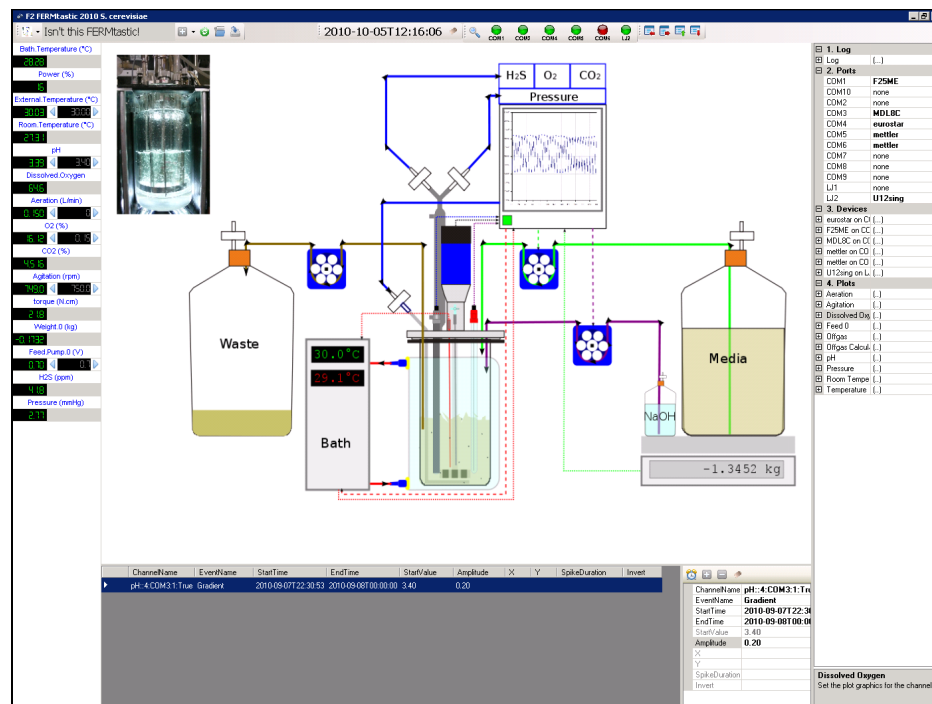


Abbildung 2.1: Darstellung des experimentellen Systems. Das Bild wurde von Dr. Douglas Murray zur Verfügung gestellt. Die Hefekultur befindet sich in einem Glasfermenter, in den Nährmedium mit einer konstante Rate fließt; der Abfluss erfolgt mit derselben Rate. Temperatur und pH-Wert werden konstant gehalten; letzterer über die Zugabe von NaOH. Die Konzentrationen von Sauerstoff, Kohlenstoffdioxid und Schwefelwasserstoff im Abgas werden detektiert.

Experiment findet sich nachfolgend beschrieben.

2.1.1 Methoden

Experimenteller Aufbau

Der experimentelle Aufbau ist in Abbildung 2.1 dargestellt. Es handelt sich dabei um einen Chemostat [82], der über einen kontinuierlichen Einfluss von Nährmedium und über einen Abfluss mit derselben Rate verfügt. Wichtige Parameter, wie Temperatur und pH-Wert werden konstant gehalten, wobei letzteres über Hinzufügen der Base NaOH geschieht. In allen Experimenten wird der Hefestamm IFO 0233 verwendet.

Es werden zwei Nährmedien verwendet, deren genaue Zusammensetzung in Anhang A angegeben ist. Verwendet wird ein Glasfermenter (Eyela, Japan). Die Temperatur der Kultur, 30 °C, wird mittels eines externen Wasserbades konstant gehalten, wie auch der pH-Wert durch automatische Zugabe von 2.5 M NaOH, der 3.4 beträgt. Die Drehzahl beträgt 750 Umdrehungen pro Minute und die Luftzufuhr rate beträgt 0.15 l · min⁻¹. Der Druck im Fermenter liegt stets unterhalb von 101.7 kPa.

Vor der Probenentnahme

Für die Proben für die CE-MS (polare Metabolite) werden 84 1.5 ml fassende Behälter (O-Ring mit Schraubdeckel, Vitton, 77692, Tomy Seiko Co., Ltd., Japan) verwendet. Für die Analyse des Exometaboloms über LC-MS 84 Eppendorfgefäße (1.5 ml), genau wie für die Proben, die zur Bestimmung des Trockengewichts dienen; diese Eppendorfgefäße werden bei 70 °C für eine Nacht lang getrocknet und das Gewicht bestimmt. Weitere 84 Eppendorfgefäße (1.5 ml) werden für die Proben, die zur Bestimmung der Zellzahl verwendet werden, benötigt.

Für die Extraktion der Metabolite wird ein Mix von Perlen mit Durchmesser von 0.1 mm (ZSB-01; Tomy Seiko Co., Ltd., Japan) und 0.5 mm (ZSB-05; Tomy Seiko Co., Ltd., Japan) benötigt, die zuvor in Salzsäure gewaschen werden. Verwendet werden pro Eppendorfgefäß insgesamt 300 μl im Verhältnis von 1:1; die Gefäße werden bei 4 °C eingelagert.

In jedes Gefäß für die CE-MS-Analyse werden 500 μl Methanol pipettiert und anschließend in einem Ethanolbad auf Trockeneis gelagert. In die Gefäße, die für die Bestimmung des Trockengewichts vorgesehen sind, werden 1 ml Ethanol (99.5%) gefüllt; in diejenigen für die Zellzahlbestimmung 233 μl - diese Gefäße werden bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Probenentnahme

Für jede Probenentnahme werden zirka 0.8 ml Zellkultur mittels einer Spritze aus dem Fermenter entnommen, die anschließend verschlossen wird. Der Stößel wird schnell entfernt und 500 μl Kultur in die Gefäße für die CE-MS-Analyse, die Methanol enthalten, pipettiert. Die Probe wird bei -9 °C und 20000g zentrifugiert und der dabei entstehende Überstand in die Gefäße für die LC-MS-Analyse überführt. Der Rückstand im Gefäß wird in 290 μl NEM-Lösung gelöst und im Ethanolbad auf Trockeneis gelagert. Anschließend wird erneut Kultur über die Spritze entnommen, diesmal rund 1.3 ml. Davon wird 1 ml in die Gefäße für die Trockengewichtsbestimmung pipettiert und 100 μl in die für die Zellzahlbestimmung.

Das Intervall der Probenentnahme beträgt 5 Minuten. Während des ersten Zyklus wird Medium, das nicht markierte Glucose enthält, verabreicht, anschließend über drei Zyklen hinweg Medium, in dem die darin befindliche Glucose ^{13}C -markiert ist und für weitere drei Zyklen wird erneut mit nicht markierter Glucose gearbeitet. Die Zeitreihe für den gelösten Sauerstoff im Medium ist in Abbildung 2.2 dargestellt.

Metabolitextraktion

Die Extraktion der Metabolite beruht auf einem in der Arbeitsgruppe von Dr. Douglas Murray entwickelten Protokoll [96]. Benötigt werden 84 Gefäße mit einem Filter von 5 kDa, die 1.5 ml fassen (UFC3LCCNB, Ultrafree®-MC, Millipore, USA). Weiterhin verwendet werden Chloroform (Wako, Japan), N-ethylmaleimide (NEM, Wako,

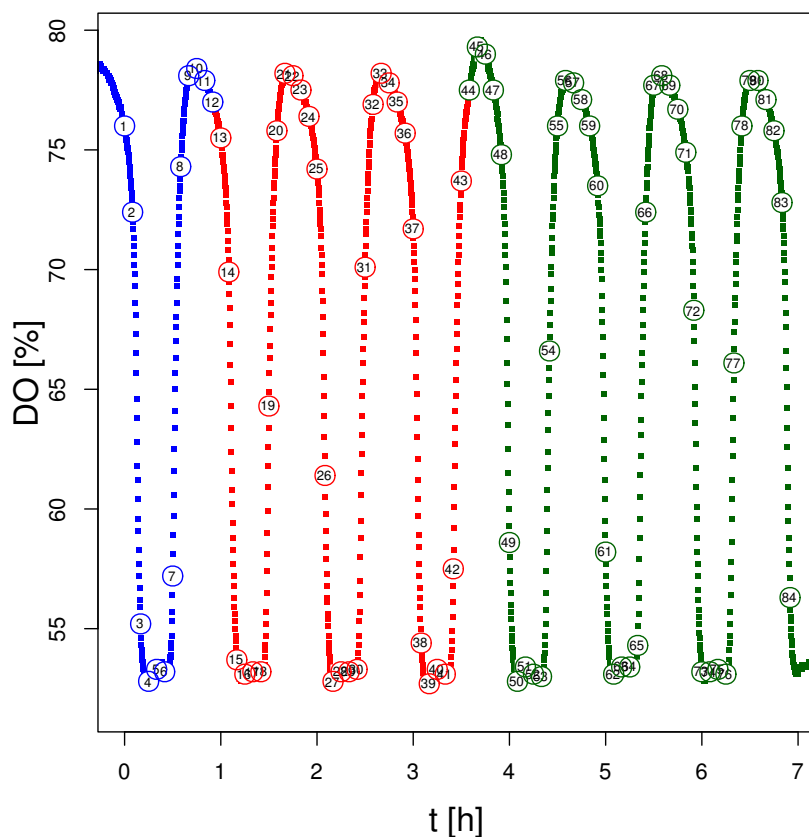


Abbildung 2.2: Übersicht über das ^{13}C -Flussexperiment dargestellt an gelösten Sauerstoff in der Kultur. Die Zeitpunkte, an denen Proben entnommen wurden, sind über Kreise markiert. Der erste Zyklus wird ohne markierte Glucose durchgeführt (blau), dann wird über drei Zyklen mit markierter Glucose gearbeitet (rot) und anschließend wieder auf unmarkierte umgeschaltet (grün).

Japan), 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES; Dojindo, Japan), D-Camphor-10-sulfonic acid (CSA; Wako, Japan) und Methionine sulfone (MetS, Wako, Japan).

Zu jeder der Proben, die für die CE-MS-Analyse vorgesehen sind, werden nun zunächst $10\ \mu\text{l}$ der Lösung mit den internen Standards hinzupipettiert; diese setzt sich wie folgt zusammen:

$0.1\ \mu\text{l}$ 100mM MES, $0.1\ \mu\text{l}$ 100mM CSA, $1\ \mu\text{l}$ 10 mM MetS und $8.8\ \mu\text{l}$ Methanol.

Anschließend werden $300\ \mu\text{l}$ Chloroform und $150\ \mu\text{l}$ MilliQ Wasser hinzugefügt. Zu diesem Gemisch werden $300\ \mu\text{l}$ von den oben erwähnten Perlen im Verhältnis von 1:1 gegeben und anschließend nach folgendem Protokoll im “Perlen-Schüttler” (MS100R; Tomy

2.1 Experiment zur metabolischen Flussanalyse mittels ^{13}C -markierter Glucose

SeikoCo., Ltd., Japan) bearbeitet: 4 x ((3 x (10 s Schütteln; 30 s Pause)); 120 s Pause).

Die Gefäße werden daraufhin bei -9°C und 20000g für 10 Minuten zentrifugiert und die wässrige Phase, die den polaren Teil des Metaboloms beinhaltet, in die Gefäße mit dem Filter überführt. Diese Gefäße werden dann so lange zentrifugiert, bei -9°C und 20000g, bis die komplette Flüssigkeit den Filter passiert hat. Die Filter werden entfernt und die Proben gefriergetrocknet, bis ein goldener Pellet erkennbar ist, der dann bei -80°C verstaut wird. Die Proben werden dann mittels Massenspektrometrie analysiert.

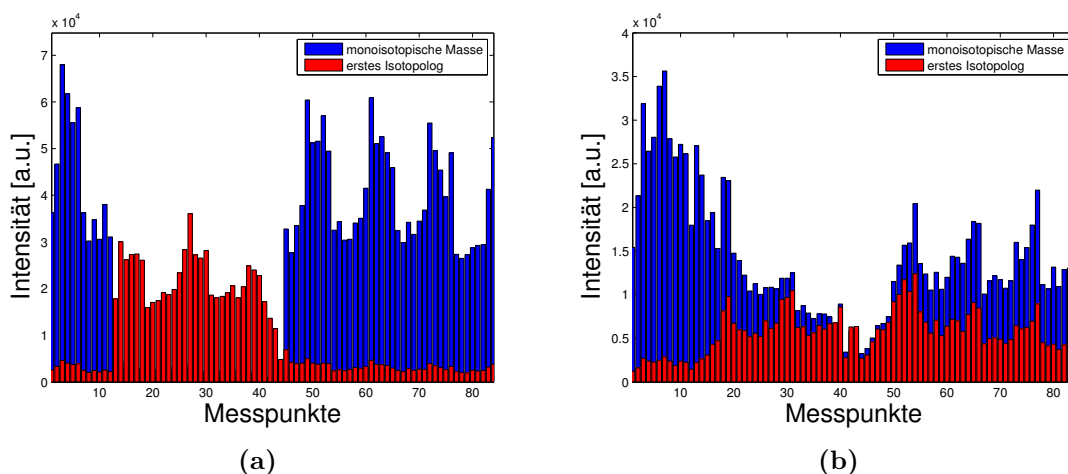


Abbildung 2.3: Zeitreihen der monoisotopischen Masse und des ersten Isotopologs für Glucose (Teilabbildung (a)) und 2-Methylcitrat (Teilabbildung (b)).

2.1.2 Vorläufige Ergebnisse

Für die ersten zwölf Probenentnahmen wird unmarkierte Glucose im Nährmedium verwendet. Anschließend erfolgt ein Umschalten auf Medium, in dem die Glucose im Nährmedium mittels ^{13}C -Atomen markiert sind, was unmittelbar nach dem Umschalten bereits detektierbar ist, wie man in Abbildung 2.3(a) sehen kann. Sie zeigt das Intensitätsprofil von Glucose-6-Phosphat, sowohl der monoisotopischen Masse als auch des ersten Isotopologs. Monoisotopisch bedeutet hier, dass alle sechs Kohlenstoffatome der Glucose ^{12}C -Atome sind, während bei dem ersten Isotopolog eines der ^{12}C -Atome durch ein ^{13}C -Atom ersetzt ist.

Man kann erkennen, dass die Intensität des ersten Isotopologs auch dann Werte größer 0 annimmt, wenn sich keine markierte Glucose im Medium befindet (Abbildung 2.3(a), Zeitpunkte 1 bis 12 und 44 - 84). Dies ist darauf zurückzuführen, dass es sich bei ^{13}C -Atomen um stabile Isotope des Kohlenstoffs handelt, die auch natürlich vorkommen; das Verhältnis von ^{12}C : ^{13}C ist dabei zirka 99:1. Bei sechs Kohlenstoffatomen würde man demnach zirka 5,7 Prozent an Glucose-6-Phosphat-Molekülen erwarten, bei denen fünf Kohlenstoffatome ^{12}C -Isotope sind und eines ein ^{13}C -Isotop, was dem hier experimentell bestimmten Wert in guter Näherung entspricht.

Unmittelbar nach Umschalten auf Nährmedium mit markierter Glucose (Zeitpunkt 13) ist ein starkes Ansteigen der Intensität des ersten Isotopologs zu beobachten, die dann bei erneutem Umschalten auf Medium mit nicht markierter Glucose (Zeitpunkt 44) wieder auf den ursprünglichen Wert abfällt. Die Übergänge sind dabei sehr scharf, was zeigt, wie rapide die Inkorporation von Glucose vonstatten geht.

Stark oszillatorisches Verhalten zeigt das Intensitätsprofil eines Metaboliten, der ein Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) von zirka 205,03 hat. In der Datenbank METLIN [107] lässt sich für diesen Wert 2-Methylcitrat identifizieren. Dabei handelt es sich um

2.1 Experiment zur metabolischen Flussanalyse mittels ^{13}C -markierter Glucose

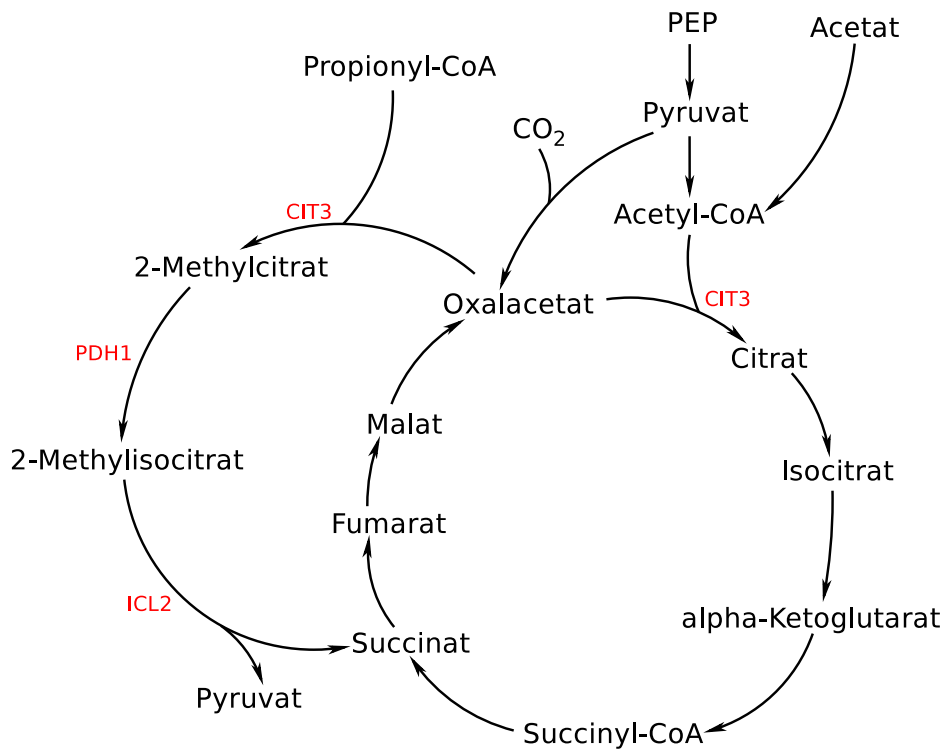


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung des Methylcitratzyklus und dessen Verbindung zum Citratzyklus. Die Abbildung wurde modifiziert von [70] übernommen.

ein Intermediat des Methylcitratzyklus, der in Abbildung 2.4 dargestellt ist. Dieser ist eng verknüpft mit dem Citratzyklus und nimmt daher eine zentrale Rolle im Metabolismus ein.

Auch hier lässt sich ein klares Markierungsmuster nach Umschalten auf Medium mit markierter Glucose feststellen, die aber leicht zeitverzögert sichtbar wird (Abbildung 2.3(b)). Das ist wohl darauf zurückzuführen, dass dieser Stoffwechselweg hauptsächlich in den Abbau von Metaboliten, wie ungeradzahligen Fettsäuren und bestimmten Aminosäuren, involviert ist, indem ein dabei anfallendes Abbauprodukt, Propionyl-CoA, in selbigen eingespeist wird. So lässt sich auch erklären, warum die Intensität des ersten Isotopologs nach Umschalten auf Medium mit unmarkierter Glucose zunächst auf einem hohen Level verbleibt und deren Amplitude sich nur langsam verringert: der Zyklus wird mit Abbauprodukten von zwischengespeicherten Metaboliten nachgefüllt. Dass ein Intermediat eines Stoffwechselweges, der in den Lipidabbau eingebunden ist, oszillatorisches Verhalten aufweist, wirft die Frage auf, wie es um die Dynamik des Lipidoms selbst bestellt ist. Ein Experiment, das diesem Sachverhalt nachgeht, ist nachfolgend dargestellt.

2.2 Die Dynamik des Lipidoms

Basierend auf den Ergebnissen des letzten Abschnittes wird ein weiterer zentraler Aspekt der metabolischen Zyklen in Hefe betrachtet, der bisher noch nicht untersucht ist. Dabei handelt es sich um das Lipidom - die Gesamtheit der in einer Zelle befindlichen Lipide - und dessen Dynamik über einen Zyklus. Lipide stellen einen essentiellen Bestandteil eukaryotischer Zellen dar und nehmen drei wichtige Funktionen innerhalb der Zelle ein [15, 32, 120]. Als Bestandteil von Membranen sind sie zum einen in die Strukturgebung und den Stoffaustausch der Zelle involviert. Gleichzeitig dienen sie als Energiespeicher und sind auch an Prozessen der Signalübertragung maßgeblich beteiligt [13, 113]. Eine Analyse der Dynamik des Lipidoms könnte somit Rückschlüsse über die zeitliche Koordination von strukturbildenden Prozessen und Vorgängen, die mit dem Energiehaushalt und der Signaltransduktion assoziiert sind, liefern. Das dazu durchgeführte Experiment ist nachfolgend dargelegt.

2.2.1 Durchführung des Experiments, Extraktion der Metabolite

Der experimentelle Aufbau ist derselbe wie in Abschnitt 2.1 dargestellte. Es wird erneut der Hefestamm IFO 0233 verwendet.

Vor der Probenentnahme

Für die Analyse der nicht polaren Metabolite über LC-MS finden 36 Eppendorfgefäße (2 ml) Verwendung, für die des Exometaboloms werden 36 Eppendorfgefäße (1.5 ml) und für die zur Bestimmung des Trockengewichts 36 Eppendorfgefäße (2 ml); diese Eppendorfgefäße werden bei 70 °C für eine Nacht lang getrocknet und das Gewicht bestimmt. Weitere 36 Eppendorfgefäße (1.5 ml) werden für die Proben, die zur Bestimmung der Zellzahl verwendet werden, benötigt. Die weiteren Arbeitsschritte bis zur Metabolitextraktion sind identisch mit denen in Abschnitt 2.1.1 beschrieben.

Metabolitextraktion

Verwendet wird dabei ein in der Arbeitsgruppe von Dr. Douglas Murray entwickeltes Protokoll [96]. Benötigt werden 36 Gefäße mit einem Filter von 5 kDa, die 1.5 ml fassen (UFC3LCCNB, Ultrafree®-MC, Millipore, USA). Weiterhin gebraucht werden Chloroform (Wako, Japan), N-ethylmaleimide (NEM, Wako, Japan), 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES; Dojindo, Japan), D-Camphor-10-sulfonic acid (CSA; Wako, Japan) und Methionine sulfone (MetS, Wako, Japan).

Zu jeder der Proben, die für die Analyse des unpolaren Metaboloms vorgesehen sind, werden nun zunächst 10 μ l der Lösung mit den internen Standards hinzugegeben; diese setzt sich wie folgt zusammen:

0.1 μ l 100mM MES, 0.1 μ l 100mM CSA, 1 μ l 10 mM MetS und 8.8 μ l Methanol.

Anschließend werden 300 μ l Chloroform und 150 μ l MilliQ Wasser hinzugefügt. Zu diesem Gemisch werden 300 μ l von den oben erwähnten Perlen im Verhältnis von 1:1 ge-

ben und anschließend nach folgendem Protokoll im “Perlen-Schüttler” (MS100R;Tomy SeikoCo., Ltd.,Japan) bearbeitet: 4 x ((3 x (10 s Schütteln; 30 s Pause)); 120 s Pause).

Die Gefäße werden daraufhin bei -9°C und 20000g für 10 Minuten zentrifugiert, die wässrige Phase, die den polaren Teil des Metaboloms beinhaltet, entnommen und wie in Abschnitt 2.1.1 beschrieben verarbeitet

Mit der im Gefäß verbliebenen Phase, in der der nicht polare Teil des Metaboloms enthalten ist, wird wie folgt verfahren: In den Boden der Gefäße wird ein kleines Loch gebohrt (Durchmesser 0.5 mm) und diese anschließend in Eppendorfgefäße, die 2 ml fassen, eingeführt und bei -9°C und 5000g für 5 Minuten zentrifugiert. Das Gefäß, in dem sich noch der Perlenmix befindet wird entfernt, und die Eppendorfgefäße, in denen die Flüssigkeit enthalten ist, noch einmal für 10 Minuten bei -9°C und 20000g zentrifugiert. Die Proben werden gefriergetrocknet und bei -80°C gelagert.

Für die Analyse des Lipidoms werden lediglich die Proben des nicht polaren Metaboloms benötigt. Aus Kostengründen erfolgt die Analyse mittels LC-MS für nur 24 der 36 Proben; diese wird von Kazutaka Ikeda am “Institute for Advanced Biosciences”, Tsuruoka, Japan, vorgenommen.

2.2.2 Auswertung und Resultate

Die Auswertung der über LC-MS erhaltenen und bereitgestellten Daten erfolgt mit der frei erhältlichen verfügbaren Software MZmine (Version 2.10) [87]. Die dafür notwendigen Arbeitsschritte und verwendeten Parameter sind im Anhang A aufgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2.5 dargestellt. Es zeigt sich, dass es sowohl im Negativ-Ionenmodus (Abbildung 2.5(a)) als auch im Positiv-Ionenmodus (Abbildung 2.5(b)) ein oszillatorisches Verhalten des Lipidoms ausgemacht werden kann. In beiden Fällen sieht man, dass es eine Klasse an Lipiden gibt, die ihre maximale Konzentration in der oxidativen während eine zweite Klasse an Lipiden diese in der reduktiven Phase verzeichnet.

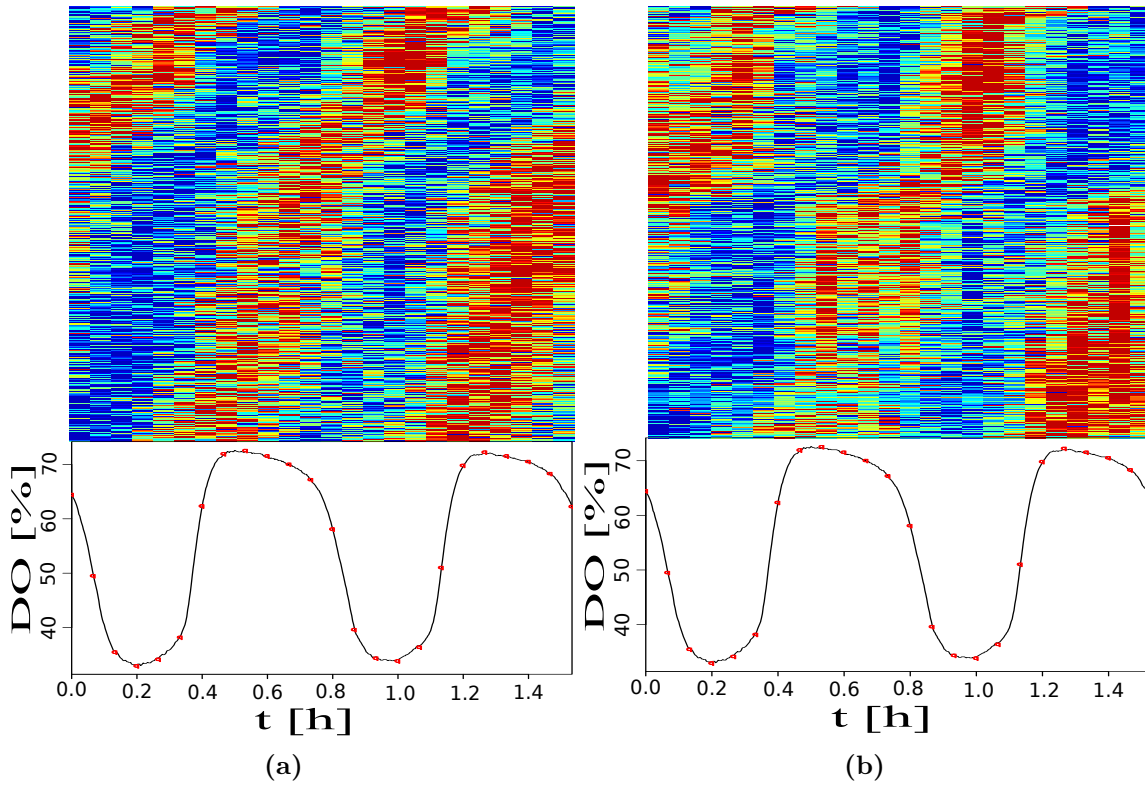


Abbildung 2.5: Intensitätsprofile der Oszillatoren mit hohem Signal-zu-Rausch-Verhältnis ($p < 0.01$) und die dazugehörige Zeitreihe für gelösten Sauerstoff. Jede Zeile korrespondiert zu einem Lipid, jede Spalte zu einem Zeitpunkt, an dem eine Probe entnommen wurde (alle 4 Minuten; durch rote Punkte gekennzeichnet). Während eine Klasse an Lipiden in der oxidativen Phase hoch- (rot) und in der reduktiven Phase niedrigkonzentriert (blau) ist, verhält es sich für die zweite Klasse umgekehrt. Teilabbildung (a) zeigt die über den Negativ-Ionenmodus erhaltenen Resultate, Teilabbildung (b) die mittels Positiv-Ionenmodus erhaltenen Ergebnisse.

2.3 Zusammenfassung und weiterführende Studien

Zum ersten Mal überhaupt wird für Hefe in einer kontinuierlichen Kultur gezeigt, dass auch das Lipidom oszillatorisches Verhalten aufweist. Dabei ist eine klare Phasenbeziehung zur respiratorischen Aktivität feststellbar: Während es eine Gruppe von Lipiden gibt, die ihre höchste Konzentration in der oxidativen Phase zu verzeichnen hat, weist eine zweite Gruppe diese in der reduktiven Phase auf.

Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass die Zelle von energiebereitstellenden zu strukturbildenden Prozessen umschaltet und umgekehrt. In diesem Falle würde man erwarten, in einer Phase überwiegend Mono-, Di- und Triglyceride - die in Energiemetabolismus involviert sind - zu finden und in der anderen komplexere Lipide, wie Sphingolipide, Zymosterol und Cardiolipins. Um diese Frage befriedigend zu beantworten, sind weitere Analysen, die eine genaue Identifikation der Oszillatoren erlaubt, vonnöten (die Identifikation der m/z-Werte mit bestehenden Datenbanken liefert nur selten eindeutige Resultate). Diese Analysen mittels LC-MS/MS werden von Kazutaka Ikeda am "Institute for Advanced Biosciences", Tsuruoka, Japan vorgenommen; die Resultate liegen mit Abschluss der Arbeit noch nicht vor.

Weiterhin wird ein Experiment durchgeführt, das die Grundlage für die Ermittlung, zeitaufgelöster Flussverteilungen bildet. Dafür wird den Zellen ^{13}C -markierte Glucose verabreicht und deren Einbau verfolgt. Wenngleich die Flussdaten noch nicht vorliegen, so lässt sich bereits aus den momentan vorhanden Daten zeigen, dass ein Metabolit, der einem Intermediat des Methylcitratzyklus (Abbildung 2.4) zuzuordnen ist, oszillatorisches Verhalten aufweist (Abbildung 2.3(b)).

Trotz der zentralen Lage dieses Stoffwechselweges ist er in Hefe bisher nicht intensiv untersucht. In einer Anschlussarbeit ließen sich Mutanten erzeugen, denen Gene für die Enzyme, die die Reaktionen des Methylcitratzyklus katalysieren, fehlen und sich die daraus ergebenden physiologischen Veränderungen gegenüber dem Wildtyp charakterisieren. Dieser Stoffwechselweg ist in den Abbau von Lipiden involviert, was eine periodische Degradation von Lipiden nahelegt und daher mit der gefundenen Dynamik des Lipidoms kompatibel ist.

Mit Hilfe der durchgeführten Experimente lässt sich der Kohlenstofffluss, der aus der Glucoseaufnahme resultiert, verfolgen, woraus sich eine zeitliche Folge von Stoffwechselaktivitäten und gegebenenfalls deren Regulation ableiten lassen. Darüber hinaus ist *Saccharomyces cerevisiae* in der Lage Kohlenstoffdioxid zu fixieren [85], was eine weitere potentielle Kohlenstoffquelle darstellt. Eine der Kohlenstoffdioxid fixierenden Reaktionen ist in Abbildung 2.4 dargestellt; es handelt sich um die Reaktion von Pyruvat zu Oxalacetat, die Kohlenstoffdioxid (in Form von Hydrogencarbonat) als Substrat benötigt. Ob es während der hier behandelten metabolischen Zyklen zur Fixierung von Kohlenstoffdioxid kommt, ist nicht bekannt. Jedoch weiß man, dass der respiratorische Quotient - das Verhältnis von Kohlenstoffdioxidabgaberate und Sauerstoffaufnahmerate - während der oxidativen Phase Werte kleiner 1 annimmt [78]. Das könnte zum einen an der Oxidation des zuvor produzierten Ethanolis liegen und/oder aber auf Fixierung

2 Charakterisierung der metabolischen Zyklen in Hefe: eine experimentelle Annäherung

von Kohlenstoffdioxid zurückzuführen sein. Um zu testen, ob Kohlenstoffdioxid fixiert wird und über welche Stoffwechselwege es nutzbar gemacht wird, soll ein Experiment, das analog zu dem in Abschnitt 2.1 beschriebenen ist, durchgeführt werden, wobei nicht Glucose über ^{13}C markiert ist, sondern Kohlenstoffdioxid.

Das zeitaufgelöste Messen des Kohlenstoffflusses basierend auf Glucoseaufnahme und einer gegebenenfalls stattfindenden Kohlenstoffdioxidfixierung sowie die gleichzeitige Analyse des Lipidabbaus über den Methylcitratzyklus wird einen beispiellosen Blick auf den zentralen Kohlenstoffmetabolismus ermöglichen.

In den nächstfolgenden Teilen der Arbeit werden die metabolischen Zyklen nun mittels computergestützter Methoden weiter untersucht. Im nächsten Kapitel wird dabei getestet, ob sich Oszillationen für die Einzelzelle als vorteilhaft erweisen können. Anschließend werden die Austauschraten für Glucose, Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid, die sich aus dem in Abschnitt 2.1 beschriebenen Experiment ergeben, verwendet, um Erkenntnisse über interne Flussverteilungen zu gewinnen.

3 Ursprung von Oszillationen in biochemischen Netzwerken

“Whether these oscillations occur as a result of the complex cross-couplings and feedbacks in metabolic pathways, or are a physiological necessity for an “efficient” metabolic transition to occur, remains to be established.” (Mochan et al., 1973)¹.

Trotzdem die metabolischen Zyklen in Hefe bereits seit sechs Jahrzehnten bekannt sind, ist die Frage, worauf diese Oszillationen beruhen und ob sie eine Funktion erfüllen, noch nicht geklärt.

In diesem Kapitel werden daher vier Szenarien, die in biochemischen Netzwerken zu Oszillationen führen können, diskutiert und analysiert. Der Fokus liegt dabei auf den metabolischen Zyklen in Hefe; Bezüge zu anderen periodischen Phänomen und Systemen werden aber ebenfalls hergestellt.

3.1 Oszillationen als intrinsische Netzwerkeigenschaft

Die Voraussetzungen, die gegeben sein müssen, um Oszillationen in biochemischen Netzwerken beobachten zu können, sind aus theoretischer Sicht detailliert beschrieben und analysiert worden. Nicht lange, nachdem die ersten biochemischen Oszillatoren [7, 8, 17, 25, 37, 89] bekannt geworden waren, wurde dargelegt, dass eine notwendige Voraussetzung für derartige Oszillationen Rückkopplung innerhalb der Reaktionswege sei [38]. Weiterhin werden eine hinreichende Zeitverzögerung innerhalb des Systems, Nichtlinearität der Reaktionskinetiken und geeignete Zeitskalen benötigt, um oszillatorische Dynamiken zu generieren [81]. Die negative Rückkopplung wird dabei gebraucht, um das System zum Ausgangspunkt der Oszillation zurückzuführen, die Zeitverzögerung des Signals der negativen Rückkopplung ist notwendig, damit das System keinen stationären Zustand erreicht und in selbigem verweilt und die Nichtlinearität der Reaktionskinetiken, um den stationären Zustand des Systems zu destabilisieren [81].

Wenn man nun nach Gründen fragt, warum man Oszillationen in biochemischen Netzwerken beobachten kann, sollte die Möglichkeit, dass diese auf derartigen intrinsischen Netzwerkeigenschaften beruhen und keine unmittelbare Funktion ausüben beziehungsweise einen Fitnessvorteil für das Individuum mit sich bringen, nicht unbeachtet bleiben. Während eine negative Rückkopplung durchaus notwendig sein kann, um beispielsweise Syntheseraten zu kontrollieren, kann die Zeitverzögerung innerhalb

¹[74]

3 Ursprung von Oszillationen in biochemischen Netzwerken

des Systems, die dann schlussendlich zu den oszillatorischen Dynamiken führt, auf unvermeidbaren Prozessen, wie Transkription, Translation, Phosphorylierung und Transport beruhen. So könnten bestimmte Oszillationen auch als Epiphänomen verstanden werden, die sich aus dem Versuch des Systems Homöostase herzustellen, ergeben.

Wenngleich der Mechanismus ein anderer ist, findet sich in den Räuber-Beute-Dynamiken [64] für derlei nicht offensichtlich funktionale Oszillationen eine anschauliche Analogie aus der Ökologie: Ein Ansteigen der Beutepopulation wird - nach einer gewissen zeitlichen Verzögerung - auch ein Ansteigen der Räuberpopulation nach sich ziehen aufgrund des steigenden Nahrungsangebots. Mit der Vergrößerung der Räuberpopulation geht - erneut nach einer zeitlichen Verzögerung - eine Verminderung der Beutepopulation einher, da diese von der erhöhten Anzahl von Räubern entsprechend dezimiert wird. Diese Dynamiken haben in dem Sinne keinen unmittelbaren Vorteil; sie beruhen auf den Interaktionseigenschaften der involvierten Spezies. Dies ist in analoger Form auch für biochemische Netzwerke denkbar, wie oben ausgeführt. Wenn diese Oszillationen nicht zu einer Verminderung der Fitness des jeweiligen Organismus führen, besteht auch kein Selektionsdruck gegen selbige.

Gegeben die hohe Komplexität auf transkriptioneller, translatorischer und metabolischer Ebene und die Interaktionen zwischen diesen, sollte das Szenario, wonach Oszillationen auf intrinsische Netzwerkeigenschaften zurückzuführen sind und keinen unmittelbaren Fitnessvorteil für das Individuum mit sich bringen, nicht ausgeschlossen werden.

3.2 Oszillationen beruhend auf einer intrinsischen Ordnung

Beim Zellzyklus handelt es sich um einen hoch regulierten Prozess mittels dem sich Zellen reproduzieren. Er ist unterteilt in mehrere Abschnitte - G1, S-Phase, G2 und M-Phase, wobei die Replikation der DNA der Zelle in der S-Phase und die Zellteilung in der M-Phase stattfinden [83]. Bei jedem Übergang von einer Phase zur nächsten Phase des Zyklus wird an einem "Kontrollpunkt" geprüft, ob die Voraussetzungen für ein erfolgreichen Abschließen der selbigen gegeben sind, wodurch sichergestellt wird, dass der Zellzyklus nur in eine Richtung verläuft, dass DNA nur einmal während des Zyklus repliziert wird und das gegebenenfalls auftretende Fehler korrigiert werden können [34, 118]. Die vorhandenen Kontrollmechanismen sind zwischen verschiedenen Spezies stark konserviert, was deren Wichtigkeit unterstreicht. Der erste Kontrollpunkt findet sich dabei in G1. Es konnte gezeigt werden, dass Zellen, die vor Erreichen des so genannten Restriktionspunktes nicht ausreichend Nahrung zur Verfügung haben, in einen Ruhezustand - die G0-Phase - übergehen und das Wachstum gestoppt wird [6]. Sobald die Hungerphase überstanden ist, können die Zellen den Zellzyklus in der G1-Phase fortsetzen. Dieser Kontrollpunkt dient offensichtlich zur Überprüfung, ob ausreichend Nährstoffe für das erfolgreiche Durchlaufen des Zellzyklus vorhanden sind. An den nächsten Kontrollpunkten - vor und nach der Replikation der chromosomalen DNA,

3.2 Oszillationen beruhend auf einer intrinsischen Ordnung

die in der S-Phase stattfindet - kann der Zellzyklus gestoppt werden, um die Reparatur von gegebenenfalls geschädigter DNA zu erlauben, wodurch die Unversehrtheit des Genoms gewährleistet wird. In der sich anschließenden M-Phase werden nun die replizierten Chromosomen getrennt und die Zelle teilt sich in zwei Tochterzellen mit identischem Genom. Vor der Trennung der Chromosome ist ein weiterer Kontrollpunkt gelagert, wo sichergestellt wird, dass die Chromosomen sich ordnungsgemäß an den mitotischen Spindelapparat befinden, was garantiert, dass beide Tochterzellen dieselbe Anzahl an Chromosomen erhalten. Die Übergänge zwischen den einzelnen Phasen verlaufen dabei stets nur in eine Richtung und unterliegen einer strengen Kontrolle so genannter Cyclin-abhängiger Kinasen (CDKs) [61], die somit die treibende Kraft des Zellzyklusverlaufs darstellen. Deren Aktivität wird - wie der Name schon sagt - von Cyclinen reguliert [42]. Während die CDK-Level über den Zellzyklus hinweg konstant bleiben, ändern sich die Konzentrationen der Cycline, was eine periodische Aktivierung der CDKs zur Folge hat [122].

Jede der einzelnen Phasen des Zellzyklus hat eine unterschiedliche Funktion und damit unterschiedliche Anforderungen an die physiologischen Gegebenheiten, was sich in der zellzyklusassoziierten Expression von zahlreichen Genen widerspiegelt [10, 94, 111, 126] und sich einer engen Verknüpfung von Metabolismus und Zellzyklusfortschreiten [5, 6, 20, 123] niederschlägt. Die Replikation von DNA erfordert beispielsweise hohe Mengen an Desoxynukleotiden (dNTPs), deren Bestände daher regelmäßig aufgefüllt werden müssen [124]. Damit konsistent variiert die Aktivität des Enzyms, das für die Umwandlung von NTPs zu dNTPs verantwortlich ist [65]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass glykolytische Enzyme mit dem Zellzyklus assoziierte Aktivitäten aufweisen [119]. Die Intermediate der Glykolyse sind während der G1-Phase hochkonzentriert [66] und sie stellt zugleich auch die Hauptquelle derjenigen Ressourcen dar, die für die Pyrimidinsynthese vonnöten ist. Auch die Level von Polyphosphaten, die ebenfalls für biosynthetische Prozesse benötigt werden, unterliegen mit dem Zellzyklus in Verbindung stehenden Schwankungen [80, 101].

Metabolische Zyklen in Hefe galten zunächst als ein mit dem Zellzyklus assoziiertes Phänomen [50, 57]. Es wurde für zellzyklussynchronisierten Hefekulturen eine Beziehung zwischen der Initiierung der Replikation der DNA und dem Metabolismus von Kohlenhydratspeichern - Trehalose und Glykogen - festgestellt. Die Kohlenhydrate akkumulieren in der G1-Phase und werden dann blitzartig abgebaut [57, 102, 103] - wohl ausgelöst durch cAMP [76] - wodurch es zu einem Ethanolausstoß kommt [50, 76, 114, 115]. Dass Hefe auch unter aeroben Bedingungen fermentieren kann, wenn hohe Glucoselevel zu verzeichnen sind, ist gut bekannt [12] und wird zum Beispiel durch das Überschreiten der respiratorischen Kapazität erklärt [108, 109, 121]. Gleichzeitig führt dieser Abbau der Kohlenhydratspeicher zu erhöhten Produktionsraten von Nukleotiden, *ATP* und Proteinen. Diese, so wird vermutet [26], schaffen die Voraussetzungen zum Durchlaufen von "Start", dem oben erwähnten ersten Kontrollpunkt im G1/S-Übergang, da ausreichend Materialien und Energie für den zügigen und vollständigen Ablauf der Replikation von DNA geschaffen werden, deren Initiierung zum Beispiel von den vorhandenen Kapazitäten zur Translation abhängen soll

[44, 45, 46, 92].

Jedoch beobachtet man die metabolischen Zyklen auch auf Ethanolmedium, wo sich keine Oszillationen von cAMP und Glykogen feststellen lassen und auch die Glykolyse nicht aktiv ist [51]. Weiterhin lassen sich die Zyklen auch in sich nicht teilenden Zellkulturen beobachten [106]. Diese Befunde lassen den Schluss zu, dass der periodische Abbau von Kohlenhydratspeicher, um die Voraussetzung für DNA-Replikation zu schaffen, nicht der zentrale Mechanismus für die Oszillationen sein kann und Zellteilung nicht notwendig ist, um metabolische Zyklen beobachten zu können.

3.3 Oszillationen als Antwort auf toxische Nebenprodukte

In mehreren Arbeiten zu den metabolischen Zyklen in Hefe konnte gezeigt werden [9, 54, 117], dass die Replikation von DNA meist in der reduktiven Phase stattfindet, wenn der oxidative Schaden am geringsten ausfällt [58], was zu der Annahme führte, dass diese Oszillationen dazu dienen, Respiration von DNA-Replikation zeitlich zu trennen. Hintergrund ist, dass Respiration nicht nur Energie in Form von *ATP* bereitstellt, sondern auch so genannte reaktive Sauerstoffspezies (ROS) produziert, die mutagen sind, also Veränderungen des Genoms hervorrufen können [47, 95].

Eine Möglichkeit, diesem Problem zu begegnen, liegt in der zeitlichen Trennung von Respiration und DNA-Replikation. Diese intuitiv sofort einleuchtende Erklärung für die zu beobachtenden Oszillationen wurde jedoch infrage gestellt. Es konnte gezeigt werden, dass sich DNA-Replikation und eine hohe Sauerstoffaufnahme nicht ausschließen, sondern dass diese während des kompletten Zyklus stattfinden kann [2, 105]. Auch lässt sich oszillatorisches Verhalten in sich nicht teilenden Zellkulturen beobachten [106]. Dennoch kann es für die Zelle notwendig sein, nach Phasen der Respiration Zeit für die Detoxifikation einzuräumen, da ROS nicht nur DNA, sondern auch Proteine und Lipide - und damit auch Membranen - schädigen; ein Zusammenbruch des Membranpotentials kann dann zum Erliegen der Energieproduktion führen [78].

3.3.1 Minimalsystem zur Untersuchung von Strategien zur Biomasseproduktion in Anwesenheit toxischer Nebenprodukte

Um der Frage nachzugehen, wie sich Vorhandenseins eines solchen Konflikts auf die Organisation des Metabolismus auswirken kann, wird ein generisches Minimalsystem untersucht, das in Abbildung 3.1 dargestellt ist (die dazugehörigen Gleichungen finden sich im Anhang B, Gleichungen B.1 und B.2).

Das System ist derart gestaltet, dass die Produktion von toxischen Substanzen unvermeidbar ist. Bei der Synthese der beiden Biomassekomponenten *C* und *D* entstehen jeweils toxische Nebenprodukte, *X* beziehungsweise *Y*. Diese haben die Eigenschaft, dass sie ein Intermediat des Syntheseweges - *A*₂ beziehungsweise *B*₂ - irreversibel ab-

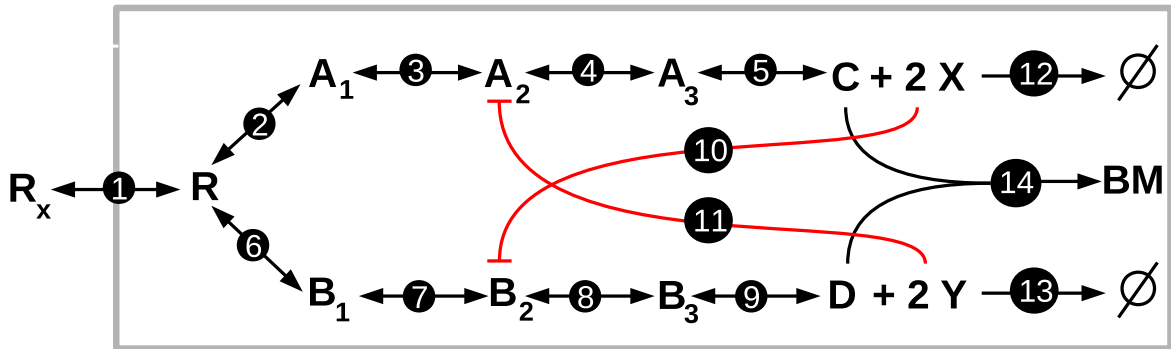


Abbildung 3.1: Schema des Minimalsystems, das zur Untersuchung von Szenario drei verwendet wird. Es besteht aus 14 Reaktionen. Reaktionen 10 bis 14 sind irreversibel, die verbleibenden reversibel. Bei der Produktion von Biomassekomponenten, C und D , werden toxische Nebenprodukte, X und Y , gebildet, die jeweils ein Intermediat der korrespondierenden Kette irreversibel abbauen können.

bauen können, was zu einer Verminderung der Gesamtbiomasseproduktion führt.

Mittels *in-silico* Evolution [30] wird dieses System auf eine Strategie hin untersucht, die die Produktion von Biomasse unter diesen Gegebenheiten maximiert. Deren genereller Ablauf ist im nächsten Abschnitt beschrieben.

3.3.2 *In-silico* Evolution - genereller Ablauf

Evolutionäre Algorithmen werden gewöhnlicherweise zur Lösung von Optimierungsproblemen verwendet, bei denen die Zahl unbekannter Parameter sehr groß ist und die für "klassische" Optimierungstechniken, wie Gradientensuche oder Simplex-Verfahren nicht zugänglich sind. Es handelt sich um ein stark iteratives Verfahren, bei dem über gewisse Generationsanzahl eine Zielfunktion optimiert wird, das auf der Biologie entlehnten Prinzipien beruht. Während die Details der Implementation unterschiedlich sein können, sind die dem Verfahren zugrunde liegenden Prinzipien stets dieselben. Im biologischen Kontext kommen diese - um nur einige Beispiele zu nennen - bei der Untersuchung von Robustheit metabolischer Netzwerke [110] und der Entstehung von Modularität [48, 49] sowie dem Auffinden optimaler Stöchiometrien *ATP*-produzierender Systeme [18, 112] zum Einsatz. Nachfolgend beschrieben ist das in der Arbeit zum Tragen kommende Verfahren.

Zunächst wird eine Population P erzeugt, die N Individuen umfasst; ein Individuum ist dabei eine Menge an Parametern, die das zu lösende Optimierungsproblem beschreibt. Die Initialisierung dieser Individuen erfolgt zufällig, wodurch eine hohe Diversität in der Anfangspopulation gewährleistet ist. Über eine Fitnessfunktion kann jedem Individuum eine Fitness zugeordnet werden, die dessen Reproduktionswahrscheinlichkeit bestimmt. Anschließend kommt es mit einer gewissen Mutationswahr-

3 Ursprung von Oszillationen in biochemischen Netzwerken

scheinlichkeit p zur Mutation dieser Individuen, die “Nachkommen” werden zur Population hinzugefügt und deren Fitness wird ebenfalls ermittelt; die Populationsgröße beträgt nun also $2N$. Die N besten Individuen werden ausgewählt und repräsentieren in der nächsten Generation die Elterngeneration. Durch das iterative Anwenden eines solchen Selektionsdrucks wird die Fitness innerhalb der Population erhöht; dieses Verfahren wird bis zum Erreichen eines geeigneten Abbruchkriteriums fortgesetzt. Diese Methode garantiert allerdings nicht, dass das globale Optimum gefunden wird. Jedoch kann über Mutationen ein lokales Optimum wieder verlassen werden, was beispielsweise bei einer Gradientensuche nicht möglich ist.

Das Verfahren ist im folgenden Pseudo-Code zusammengefasst:

```
Generation  $g = 0$   
initialisiere  $N$  Individuen  
  
while (Abbruchbedingung nicht erfüllt)  
  for jede Zelle  $z$   
    mutiere  $z$   
    füge  $z$  zur Population hinzu  
  
  for jede Zelle  $z$   
    bestimme Fitness von  $z$   
  
  selektiere die  $N$  besten Zellen
```

Die genaue Ausgestaltung und die verwendeten Parameter sind im Anhang B Abschnitt B.1.2 dargelegt und ist in [30] in einem anderen Kontext auf Funktionalität getestet.

3.3.3 Ergebnisse

In Abbildung 3.2 sind die Simulationen für eine der mittels *in-silico* Evolution gefundenen Lösungen dargestellt; die Regulation besteht dabei in einer Inhibition der Reaktion v_6 durch D . D inhibiert also dessen eigene Synthese. Abbildung 3.2(a) zeigt die Konvergenz der Durchschnittsfitness der Population, die hier bereits nach 400 Generationen zu beobachten ist. Obgleich die Simulationen in konstanter Ergebung erfolgen, demnach also kein periodisches äußeres Signal vorhanden ist, sind die optimalen Lösungen oszillatorischen Charakters. Die Ketten sind dabei antiphasisch aktiv (Abbildungen 3.2(b) bis 3.2(d)), was zur Folge hat, dass die Produktion der Intermediate, die durch toxische Nebenprodukte abgebaut werden können, zeitlich von deren Produktion getrennt ist (Abbildungen 3.2(e) und 3.2(f)).

3.3 Oszillationen als Antwort auf toxische Nebenprodukte

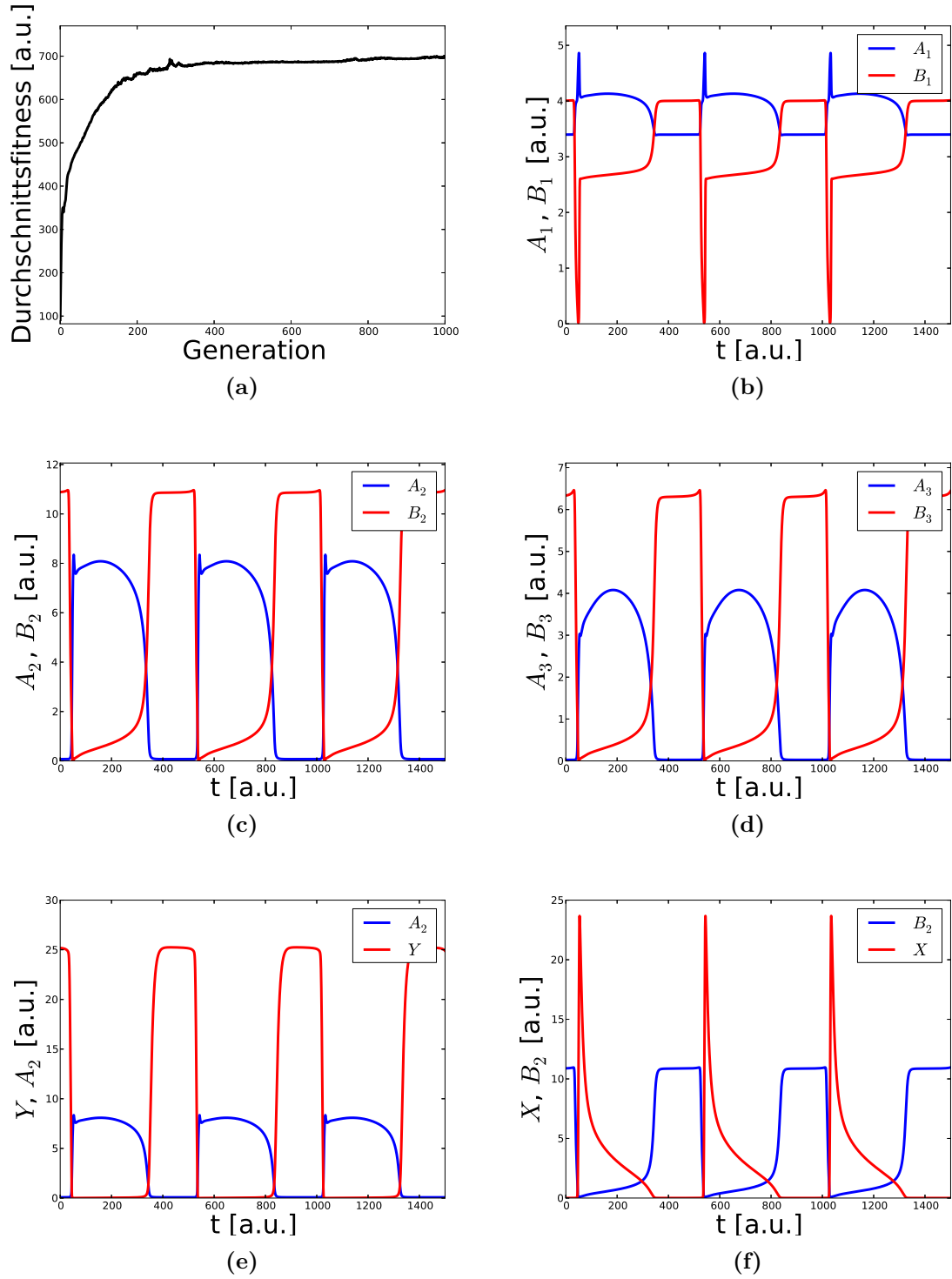


Abbildung 3.2: Zeitreihen für eine der Lösungen, die mittels *in-silico* Evolution erzielt wird; hierbei inhibiert D die Reaktion v_6 . Teilabbildung (a) zeigt die Konvergenz der Durchschnittsfitness der Population. Teilabbildungen (b) bis (d) zeigen die Zeitverläufe der Intermediate der jeweiligen Ketten. Teilabbildungen (e) und (f) zeigen die Zeitverläufe der toxischen Nebenprodukte, X und Y , und die Zeitverläufe der Metabolite, die durch selbige abgebaut werden können, A_2 beziehungsweise B_2 .

3 Ursprung von Oszillationen in biochemischen Netzwerken

Der Schaden, der durch die toxischen Nebenprodukte hervorgerufen wird, kann über eine solche zeitliche Trennung von Syntheseschritten offenbar gemindert werden.

Um zu testen, inwieweit sich die Möglichkeit zur Regulation des Stoffwechsels auf die Biomasseproduktion auswirkt, werden Zellen in derselben Umgebung evolviert, die aber nicht die Möglichkeit haben, ihren Stoffwechsel entsprechend zu regulieren; es werden lediglich die Ratenkonstanten mutiert, während die Regulationsterme derart gewählt sind, dass sie die Raten nicht modifizieren können.

In Abbildung 3.3 sind beide Lösungen vergleichend abgebildet. Abbildungen 3.3(a) und 3.3(c) zeigen die Dynamiken der Raten, die die Biomassekomponenten C und D produzieren. Wenn keine Regulation erlaubt ist, sind beide Raten konstant und identisch, da die Biomassekomponenten im Verhältnis 1:1 benötigt werden. Wird eine Regulationsstruktur verwendet, so beobachtet man - wie oben bereits erwähnt - ein Umschalten zwischen beiden Ketten, was zu einer stufenartigen Akkumulation der Biomasse führt (Abbildung 3.3(b)), während sie im Falle von nicht vorhandener Regulationsstruktur linear erfolgt (Abbildung 3.3(d); weitere typische Ergebnisse für den Fall, dass keine Regulationsstruktur evolviert werden darf, sind in Abbildung B.1 im Anhang B dargestellt).

Die Lösungen für die ermittelten Regulationsstrukturen sind nicht eindeutig, sondern hängen von den Anfangsverteilungen der Parameter ab; die beiden sich dabei qualitativ ergebenden Lösungen sind in Abbildung 3.4 dargestellt. Die Biomassekomponente kann dabei entweder direkt die eigene Synthese inhibieren, indem der erste Schritt der eigenen Synthese inhibiert wird (Abbildung 3.4(a)), oder aber indirekt, indem der erste Schritt der Synthese der anderen Biomassekomponente aktiviert wird (Abbildung 3.4(b)). Da das System symmetrisch angelegt ist, finden sich diese Regulationsstrukturen für beide Biomassekomponenten.

In Tabelle 3.1 findet sich ein Vergleich der Fitnesswerte zwischen den einzelnen Regulationsstrukturen sowie zwischen den Individuen mit und ohne der Möglichkeit zur Regulation. Es zeigt sich, dass die Fähigkeit zur Regulation und damit die Fähigkeit, den Metabolismus zeitlich zu koordinieren, einen deutlichen Fitnessvorteil mit sich bringt. Die Biomasseproduktion liegt im Falle einer oszillatorischen Lösung zirka 30 Prozent über derjenigen Lösung, die erzielt wird, wenn keine Regulationsmöglichkeit besteht. In 32 von 50 Fällen inhibiert die jeweilige Biomassekomponente ihre eigene Synthese mittels einer negativen Rückkopplung. In weiteren 10 Fällen aktiviert eine Biomassekomponente die Synthese der anderen, was - da sie um dieselbe Ressource R konkurrieren - ebenfalls zu einer Inhibition der eigenen Synthese führt.

3.3.4 Fazit

In diesem Kapitel ist anhand eines generischen Systems untersucht, inwieweit sich die Produktion von toxischen Nebenprodukten auf die Dynamiken des Stoffwechsels auswirken kann. Für die Lösung eines solchen Konflikts gibt es generell zwei Strategien: Zum einen könnte die Produktion der toxischen Nebenprodukte mit geringen Raten

3.3 Oszillationen als Antwort auf toxische Nebenprodukte

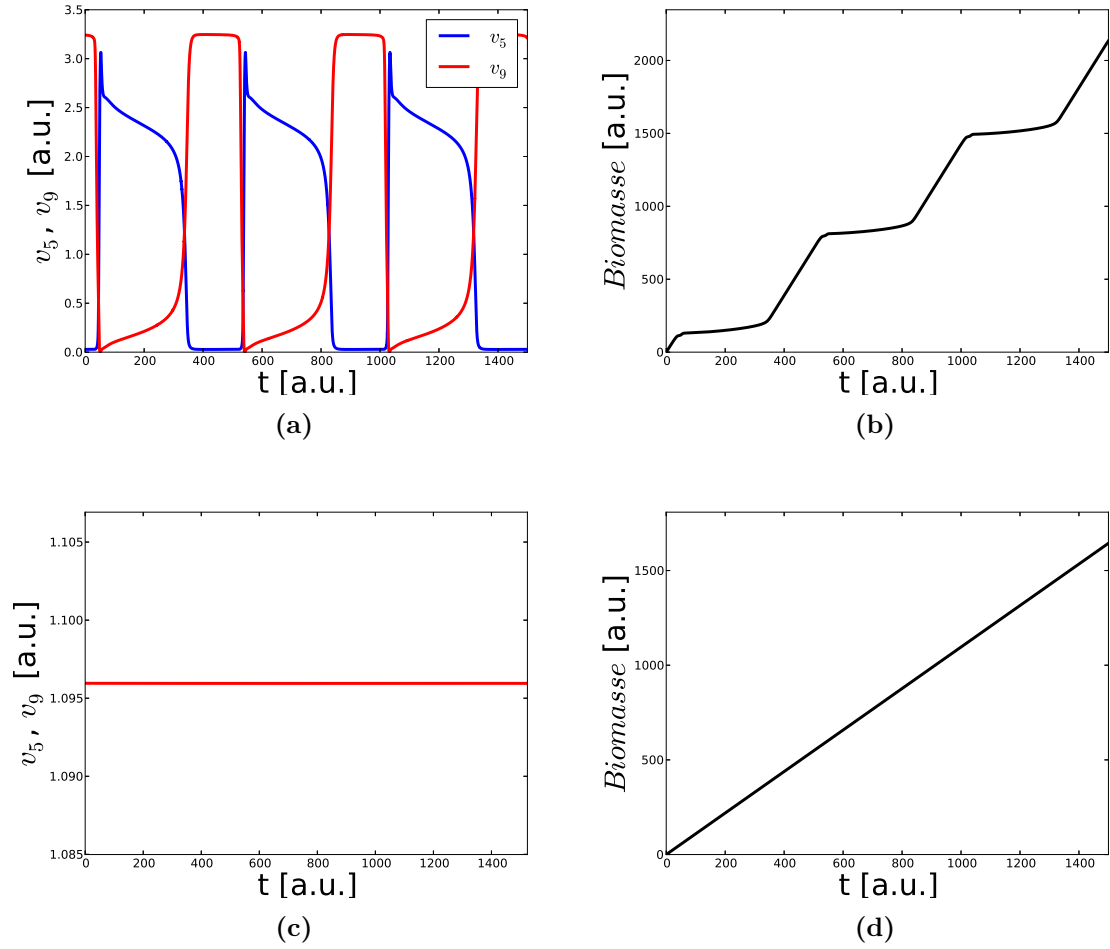


Abbildung 3.3: Vergleich der Flüsse, die die Biomassekomponenten C und D produzieren, v_5 beziehungsweise v_9 , und der Zeitverlauf der daraus resultierenden Biomasse für Zellen, die ihren Metabolismus regulieren und denjenigen, die diese Möglichkeit nicht besitzen. Besteht die Möglichkeit zur Regulation, sind beide Reaktionen zeitversetzt aktiv (Teilabbildung (a)) und die Akkumulation von Biomasse folgt einer Stufenfunktion (Teilabbildung (b)). Besteht hingegen keine Möglichkeit zur Regulation, nehmen die beiden Raten denselben Wert an (Teilabbildung (c)), da die Biomassekomponenten im Verhältnis 1:1 benötigt werden. Die Akkumulation der Biomasse erfolgt somit linear (Teilabbildung (d)).

ablaufen, was die Schädigung geringhält, aber gleichzeitig auch die Produktion von den Zielmetaboliten auf einem niedrigen Level verlaufen lassen würde. Die zweite Strategie besteht darin, beide Ketten zeitlich getrennt voneinander ablaufen zu lassen. Das hätte zur Folge, dass die Produktion des toxischen Nebenprodukts, das ein Intermediat der korrespondierenden Kette schädigt, zeitlich von dessen Produktion getrennt wäre.

3 Ursprung von Oszillationen in biochemischen Netzwerken

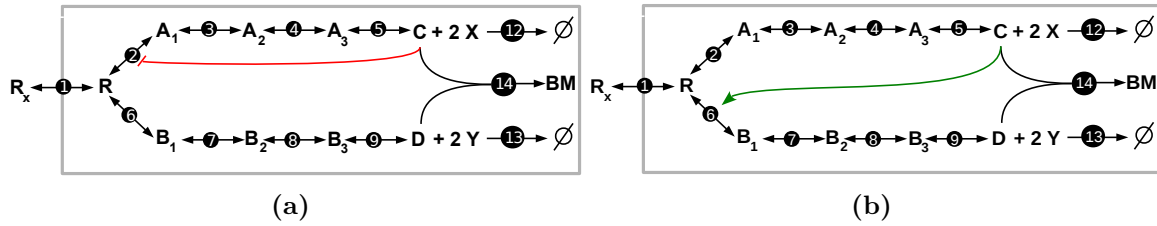


Abbildung 3.4: Die zwei qualitativen Lösungen der *in-silico* Evolution hier dargestellt für die Biomassekomponente C . Aufgrund der Symmetrie des System findet man die analogen Lösungen auch für D . Die Biomassekomponente kann dabei die eigene Synthese inhibieren (Teilabbildung (a)) oder aber die Produktion der anderen Biomassekomponente aktivieren (Teilabbildung (b)).

	keine Reg.	$C \dashv v_2$	$D \rightarrow v_2$	$C \dashv v_3$	$C \rightarrow v_6$	$D \dashv v_6$
Biomasse	511 ± 30	693 ± 15	672 ± 73	642 ± 33	671 ± 25	681 ± 34
Häufigkeit	-	17/50	4/50	4/50	6/50	11/50

Tabelle 3.1: Die evolvierten Regulationsstrukturen und die daraus resultierende Biomasseproduktion. Alle Größen sind in beliebigen Einheiten angegeben. In der ersten Zeile findet sich akkumulierte Biomasse im Integrationsintervall T (hier $T = 500$), die die Fitness der Zellen repräsentiert. Dabei wird stets der Durchschnittswert der jeweils besten Individuen für insgesamt 50 verschiedene Startbedingungen ermittelt. Die Häufigkeit, mit der eine bestimmte Regulationsstruktur evolviert wird, ist in Zeile 2 angegeben. In acht Fällen wurde die Simulation vor Erreichen der Konvergenz abgebrochen. Werden Zellen in derselben Umgebung evolviert, die aber nicht die Möglichkeit haben, Regulationsstrukturen zu etablieren, produzieren diese deutlich weniger Biomasse (Spalte "keine Reg."); getestet wird dabei für 10 verschiedene initiale Parameterverteilungen.

Nachteil wäre jedoch, dass die Ketten jeweils nicht für die komplette Zeit aktiv wären.

Hier wird mittels *in-silico* Evolution gezeigt, dass eine zeitliche Kompartimentierung die Fitness des Individuums erhöhen kann, da so eine effiziente Trennung der Produktion toxischer Nebenprodukte und der Produktion der Metabolite, die durch ebenjene Nebenprodukte geschädigt werden, realisiert wird. Wird dasselbe System in derselben Umgebung evolviert, ohne dabei die Möglichkeit zu haben, den Metabolismus zu regulieren, sind die daraus resultierenden Lösungen nicht oszillatorischen Charakters und es wird deutlich weniger Biomasse produziert.

Die dabei am häufigsten auftretende Regulationsstruktur ist eine negative Rückkopplung einer Biomassekomponente auf die eigenen Synthese, wodurch das Umschalten zwischen den Ketten ermöglicht wird. Diese Struktur kennt man beispielsweise aus der Aminosäuresynthese [1] und erinnert auch stark an die des Goodwin-Oszillators [29, 31], der die Grundlage zahlreicher Modelle für zirkadiane Rhythmen bildet [28, 93]. Das Umschalten zwischen den Ketten ist sehr abrupt (Abbildung 3.3(a)), was auf die

3.3 Oszillationen als Antwort auf toxische Nebenprodukte

hohe Nichtlinearität der hier verwendeten Regulationsterme (Anhang B, Gleichungen B.4) - der Hillkoeffizient beträgt 10 - zurückzuführen ist. Die sinnvolle Verwendung solcher Hillfunktionen ist ein kontroverses Thema [125]; in biologischen Systemen nehmen die Hillkoeffizient üblicherweise keine Werte größer $n = 4$ an, so dass der hier gewählte unrealistisch hoch erscheinen mag. Jedoch unterliegt der hohe Hillkoeffizient in diesem hier dargestellten Kontext weniger einer biologischen als vielmehr einer "technischen" Interpretation, da hier nicht versucht wird quantitativ Enzymkinetik abzubilden, sondern das qualitative Verhalten von Minimalmodellen untersucht wird.

Die zeitliche Trennung inkompatibler Prozesse ist allerdings nicht nur hinsichtlich der metabolischen Zyklen in Hefe von Bewandtnis. So könnte die Vermeidung von Schäden, die durch oxidativen Stress hervorgerufen werden, auch eine der Triebkräfte für das Entstehen zirkadianer Rhythmen gewesen sein. In [19] wird gezeigt, dass Peroxiredoxine - die in den Abbau von ROS involviert sind [128] - einen 24 Stunden Rhythmus aufweisen, der sehr stark über Speziengrenzen hinweg konserviert ist. Aber nicht nur oxidativer Stress kann zur Schädigung von DNA führen, sondern auch UV-Licht. In [27] wird nahegelegt, dass Fotorezeptoren, die blaues Licht zu detektieren in der Lage sind und zirkadiane Rhythmen co-evolvierten. Dadurch waren die ersten Metazoen in den Ozeanen in der Lage, auf für sie ungefährliche Tiefen abzusinken, um UV-Strahlung zu vermeiden, da Licht entsprechend antizipiert werden konnte. Die Fähigkeit zur Antizipation von Licht ist auch für andere Organismen von Relevanz, wie zum Beispiel für bestimmte Cyanobakterien, die zwei essentielle und inkompatible Prozesse aufeinander abzustimmen haben: Stickstofffixierung und Fotosynthese. Enzyme, die für die Stickstofffixierung vonnöten sind, können durch molekularen Sauerstoff - der in der Fotosynthese produziert wird - geschädigt werden. Dieser Konflikt kann zum einen durch eine räumliche Trennung als auch durch eine zeitliche aufgelöst werden, indem die Stickstofffixierung während der Nacht erfolgt, wenn aufgrund Lichtmangels keine Fotosynthese ablaufen kann [72, 73]. Die Notwendigkeit für Detoxifikation wird auch im Kontext von Schlaf diskutiert. Obwohl diverse Theorien darüber existieren, warum Organismen schlafen (müssen) [71], ist die Funktion, die Schlaf ausübt, immer noch eine offene Frage. In verschiedenen Arbeiten wird darüber spekuliert, ob Schlaf nicht dazu dienen würde, den Organismus zu detoxifizieren: In [41] wird gesagt, dass Schlaf für die neuronalen Detoxifikation benötigt würde. In einer weiteren Arbeit wird auf die Fähigkeit Melatonins - ein Hormon, das überwiegend während des Schlafens produziert wird - verwiesen, toxische Carbonyl-Verbindungen abzubauen [132]. In Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass der Raum zwischen Gehirnzellen um 60 Prozent vergrößert ist, wenn die Mäuse schlafen [130]; die Folge dieser Vergrößerung ist ein erhöhter Abtransport toxischer Substanzen, wie zum Beispiel von β -Amyloid - ein Protein, das mit der Krankheit Alzheimer assoziiert ist - das dann zweimal so schnell abtransportiert werden kann wie in wachen Mäusen. Der Fluss von Abfallprodukten beträgt in wachen Mäusen nur ungefähr 5 Prozent von dem, der in schlafenden zu verzeichnen ist.

Anhand dieser Beispiele ist ersichtlich, dass die hier gefundenen Dynamiken ein gene-

3 Ursprung von Oszillationen in biochemischen Netzwerken

relles Wachstumsprinzip verdeutlichen könnten.

3.4 Oszillationen stellen ein optimales Reaktionsmilieu ein

Kompartimente spielen eine wichtige Rolle in Eukaryoten. Sie erlauben dem Organismus einen hohen Grad an Spezialisierung, das Etablieren verschiedener Reaktions- und Redoxmilieus, die das simultane Ausführen von Reaktionen mit unterschiedlichen physiologischen Anforderungen gestatten. Aber auch innerhalb eines Kompartiments können - trotz aller Spezialisierung - die einzelnen Stoffwechselwege unterschiedliche Anforderungen an das vorherrschende Reaktionsmilieu haben. In diesem Abschnitt wird getestet, wie sich die unterschiedlichen Anforderungen an das Reaktionsmilieu auf die Organisation des Metabolismus auswirken können. Dafür werden zwei verschiedene Fälle untersucht:

Maximierung der Wachstumsrate Die Wachstumsrate wird bei begrenzter enzymatischer Kapazität maximiert.

Minimierung des Enzymbedarfs Die Enzymmenge, die notwendig ist, um eine bestimmte Ratenverteilung zu erreichen, wird minimiert.

Verwendet werden dabei erneut Minimalsysteme, die ein solches Szenario abbilden. Im ersten Fall wird die Wachstumsrate mittels *in-silico* Evolution maximiert; der Enzymbedarf hingegen über eine in [23] beschriebene Methode minimiert.

3.4.1 Maximierung der Wachstumsrate

Wie schon in Abschnitt 3.3 wird auch hier ein generisches System betrachtet; dieses ist in Abbildung 3.5 dargestellt. Es besteht aus zwei Ketten, deren Endprodukte, C und D , die Vorläufer der Biomasse darstellen. Die dazugehörigen Raten- und Differentialgleichungen sind im Anhang B angegeben (Gleichungen B.5 und B.7).

Für eine effiziente Synthese von C werden hohe Konzentrationen von F_1 benötigt, während die Konzentration von F_2 möglichst gering sein soll. Für die Bildung von D verhält es sich umgekehrt. F_1 und F_2 werden dabei nicht netto verbraucht oder konsumiert, sondern repräsentieren lediglich unterschiedliche Reaktionsmilieus. Eine Konvertierung des Reaktionsmilieu ist möglich (Reaktionen v_{11} und v_{12}).

Das System wird mittels *in-silico* Evolution [30] hinsichtlich optimaler Strategien der Biomasseproduktion untersucht. Die Zielfunktion ist also die akkumulierte Biomasse in einem Zeitintervall T , mit $T = 500$. Der für die *in-silico* Optimierung verwendete Algorithmus ist dabei derselbe wie in Abschnitt 3.3. Details zur Implementierung finden sich im Anhang B (Abschnitt B.2).

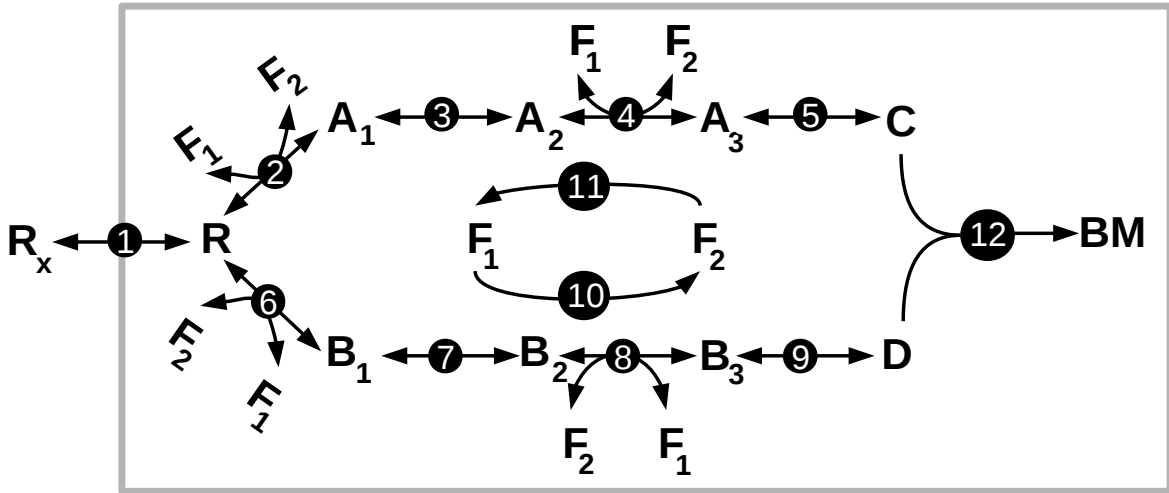


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung eines metabolischen Systems, das zwei verschiedene Reaktionsmilieus repräsentiert. Es besteht aus 12 Reaktionen. Reaktionen 10 bis 12 sind irreversibel, die verbleibenden reversibel. Die Produktionswege der Biomassekomponenten, C und D, haben unterschiedliche Anforderungen an das Reaktionsmilieu: Während die Produktion von C besonders effizient abläuft, wenn die Konzentration von F₁ hoch und die von F₂ niedrig ist, verhält es sich genau entgegengesetzt für die Produktion von D.

In-silico Evolution - Ergebnisse

Auch für dieses System erhält man stabile sich selbst erhaltende Oszillation in einer nicht fluktuierenden Umgebung (R_x ist konstant und beträgt 10). Eine der Lösungen, die man mittels *in-silico* Evolution erhält, ist in Abbildung 3.7 visualisiert. In dieser dargestellten Lösung erfolgt eine Inhibierung der Reaktion v_{11} durch C und eine Aktivierung der Reaktion v_{10} durch F₂ (dargestellt in Abbildung 3.6).

Abbildung 3.7(a) zeigt die Konvergenz der Durchschnittsfitness der Population. Gut zu erkennen ist der Sprung in der Fitness bei Generation 165, ab der sich die gefundene Regulationsstruktur innerhalb der Population durchsetzt. Die Abbildungen 3.7(b) bis 3.7(d) zeigen die Zeitverläufe der Intermediate der beiden Ketten und Abbildung 3.7(e) die Zeitverläufe von F₁ und F₂. Abbildung 3.7(f) zeigt die Aktivitätsprofile der beiden Regulationsterme sowie die beiden Raten der die Biomassekomponenten produzierenden Reaktionen, v_5 beziehungsweise v_9 . Es ist ersichtlich, dass zwischen den Ketten hin- und hergeschaltet wird. Somit ist jede der Ketten zwar nur die Hälfte der Zeit maximal aktiv, die Reaktionen können dabei allerdings in dem für sie optimalen Milieu ablaufen. Beide Regulationsterme weisen dabei oszillatorisches Verhalten auf und schalten zwischen den beiden Extremwerten 0 (Inhibition der Rate) und 1 (Aktivierung der Rate) hin und her, nehmen also eine regulierende Rolle ein, indem sie die Raten v_{10} und v_{11} aktivieren beziehungsweise inhibieren. Nimmt die Konzentration C einen entsprechend hohen Wert an, inhibiert sie die Umwandlung von F₂ zu F₁, was

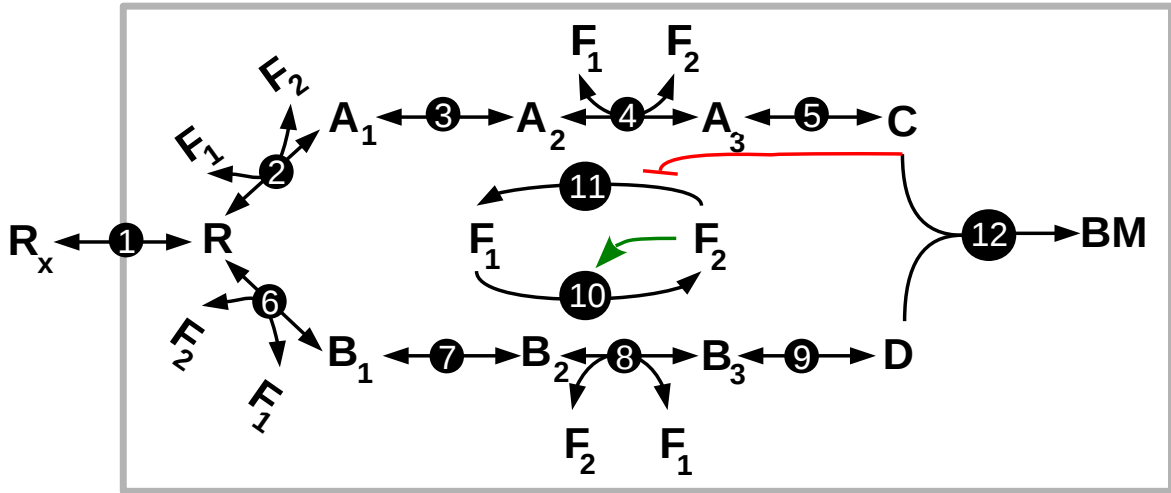


Abbildung 3.6: Visualisierung der Regulationsstrukturen für eine der über *in-silico* Evolution bestimmten Lösungen. Die Biomassekomponente C inhibiert die Reaktion v_{11} , während das Co-Substrat F_2 die eigene Synthese aus F_1 aktiviert.

eine Inhibition der Synthese von C zur Folge hat. Die hohen Level an F_1 sinken, genau wie die Rate v_5 und es wird F_2 gebildet, das für die Synthese von D - der zweiten Biomassekomponenten - vonnöten ist.

Für das schnelle Umschalten ist die zweite regulierende Struktur verantwortlich; dabei aktiviert F_2 dessen eigene Bildung aus F_1 , was mit einem rapiden Ansteigen von v_9 - der Reaktion, die zur Synthese von D führt - einhergeht 3.7(f).

Während die Inhibition von v_{11} durch C für das Umschalten zwischen den Ketten benötigt wird, garantiert die Aktivierung der Reaktion v_{10} durch F_2 , dass dieses Umschalten schnell vonstatten gehen kann. Dieses schnelle Umschalten wird möglich - wie bereits in Kapitel 3.3.4 diskutiert - aufgrund der hohen Nichtlinearität der Regulationsterme (B, Gleichungen B.4), für die ein Hillkoeffizient von 10 verwendet wird.

Die über *in-silico* Evolution erhaltenen Lösungen sind abhängig von den Anfangsbedingungen der Parameter für die Regulationsterme und der Ratenkonstanten. In Tabelle 3.2 sind diejenigen Regulationsstrukturen aufgeführt, die mehr als zweimal bei 50 verschiedenen initialen Parameterverteilungen ermittelt wurden. Wenngleich sich die jeweiligen Interaktionen unterscheiden, so sind die erhaltenen Fitnesswerte für die verschiedenen Regulationsstrukturen sehr ähnlich. Optimiert man dasselbe System, ohne dass derartige regulierende Interaktionen Verwendung finden dürfen, wird wesentlich weniger Biomasse produziert (Tabelle 3.2).

3 Ursprung von Oszillationen in biochemischen Netzwerken

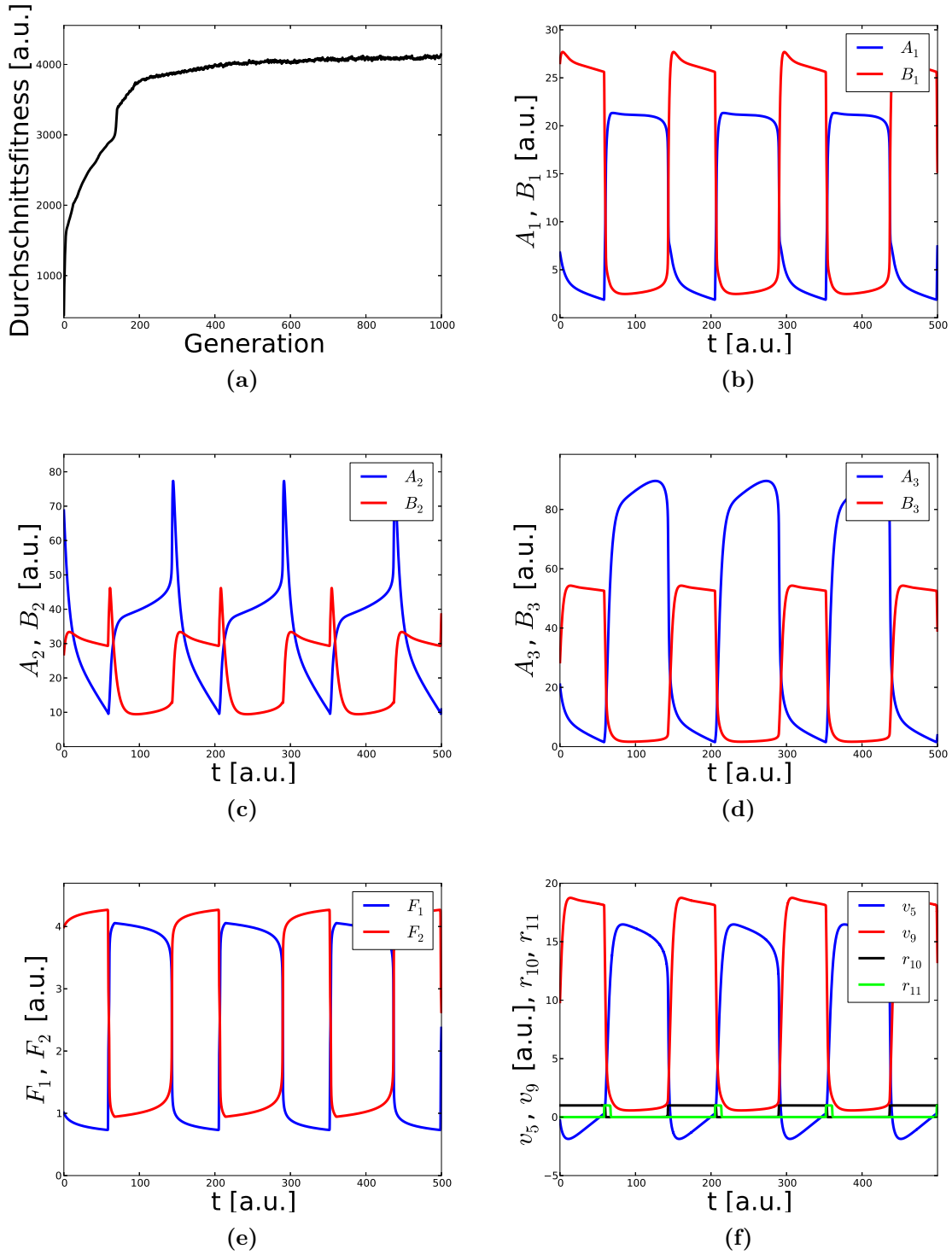


Abbildung 3.7: Zeitreihen für eine der evolvierten Lösungen des Minimalsystems dargestellt in Abbildung 3.5. Hierbei inhibiert C v_{11} und F_2 aktiviert v_{10} . Teilabbildung (a) zeigt die Konvergenz der Durchschnittsfitness der Population. Teilabbildungen (b) bis (d) zeigen die Zeitverläufe der Intermediate der jeweiligen Ketten. Teilabbildung (e) zeigt die Zeitverläufe von F_1 und F_2 . Teilabbildung (f) zeigt die Flüsse v_5 und v_9 , die zur Bildung der Biomassekomponenten C und D führen, sowie die Zeitverläufe der Regulationsterme. Diese alternieren zwischen 0 (Inhibierung) und 1 (Aktivierung).

3.4 Oszillationen stellen ein optimales Reaktionsmilieu ein

	keine Reg.	$C \rightarrow v_{10} \wedge F_1 \rightarrow v_{11}$	$D \rightarrow v_{11} \wedge F_2 \rightarrow v_{10}$	$C \dashv v_{11} \wedge F_2 \rightarrow v_{10}$
Biomasse	3045 ± 2	4278 ± 182	4269 ± 74	4392 ± 119
Häufigkeit	-	5/50	7/50	6/50

Tabelle 3.2: Die evolvierten Regulationsstrukturen und die daraus resultierende Biomasseproduktion. Alle Größen sind in beliebigen Einheiten angegeben. In der ersten Zeile findet sich die akkumulierte Biomasse im Integrationsintervall T (hier $T = 500$), die die Fitness der Zellen repräsentiert. Dabei wird stets der Durchschnittswert der jeweils besten Individuen für insgesamt 50 verschiedene Startbedingungen ermittelt. Die Häufigkeit, mit der eine bestimmte Regulationsstruktur evolviert wird, ist in Zeile 2 angegeben. Aufgeführt sind diejenigen Lösungen, die mindestens zweimal auftreten. In 24 von 50 Fällen wird keine oszillatorische Lösung ermittelt. Werden Zellen in derselben Umgebung evolviert, die aber nicht die Möglichkeit haben, Regulationsstrukturen zu etablieren, produzieren diese deutlich weniger Biomasse (Spalte "keine Reg."); getestet wird dabei für 10 verschiedene initiale Parameterverteilungen.

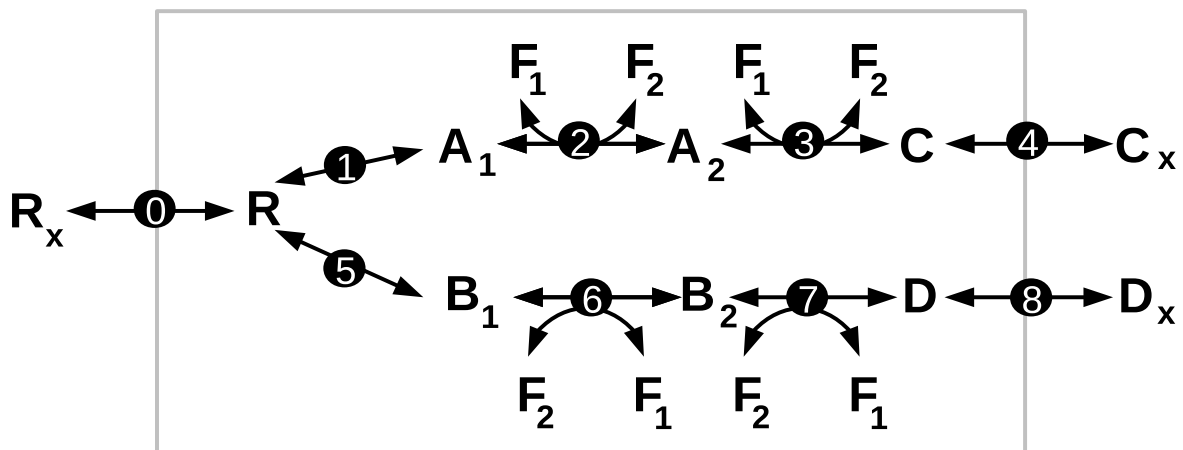


Abbildung 3.8: Das Schema des untersuchten Systems. Es besteht aus acht Reaktionen, die alle reversibel sind. Die Produktionswege für C und D haben unterschiedliche Anforderungen an das Reaktionsmilieu: Während die Produktion von C besonders effizient abläuft, wenn die Konzentration von F_1 hoch und die von F_2 niedrig ist, verhält es sich genau entgegengesetzt für die Produktion von D .

3.4.2 Minimierung des Enzymbedarfs

Im vorangegangenen Abschnitt ist gezeigt, dass bei einer begrenzten enzymatischen Kapazität ein Umschalten zwischen Stoffwechselwegen, die gegenläufige Anforderungen an das Reaktionsmilieu aufzeigen, die Biomasseproduktion gegenüber einem System, in dem diese Stoffwechselwege gleichzeitig aktiv sind, erhöhen kann.

Dies entspricht dem ersten in Abschnitt 3.4 dargelegten Fall. Hier wird nun getestet, ob über eine solche zeitliche Trennung von Stoffwechselaktivitäten der Enzymbedarf, der notwendig ist, um eine bestimmte Rate zu erzielen, verringert werden kann. Dies wird in diesem Abschnitt anhand eines Fallbeispiels getestet. Das dafür verwendete System - in Abbildung 3.8 dargestellt - ähnelt dem aus dem vorangegangenen Kapitel. Es wird allerdings nicht evolviert, sondern es kommt eine in [23] publizierte Methode zum Einsatz, die es erlaubt, Enzymkosten in Reaktionswegen zu berechnen. Getestet wird, ob sich über ein Umschalten zwischen den beiden Synthesewegen für C und D Enzymkosten vermindern lassen, wenn diese zum Zeitpunkt T mit einer bestimmten Konzentration vorliegen sollen. Dafür werden zwei Strategien hinsichtlich ihres Enzymbedarfs untersucht, die in Abbildung 3.9 für v_4 wiedergegeben sind.

Strategie 1 Die Produktionsraten v_4 und v_8 sind über den gesamten Zeitraum T hinweg konstant; die Synthese der Metabolite C und D erfolgt daher kontinuierlich.

Strategie 2 Die Produktionsraten v_4 und v_8 sind jeweils nur für die Hälfte des Zeitraums T aktiv. Während zum Beispiel v_4 in der ersten Hälfte des Zeitraums aktiv und

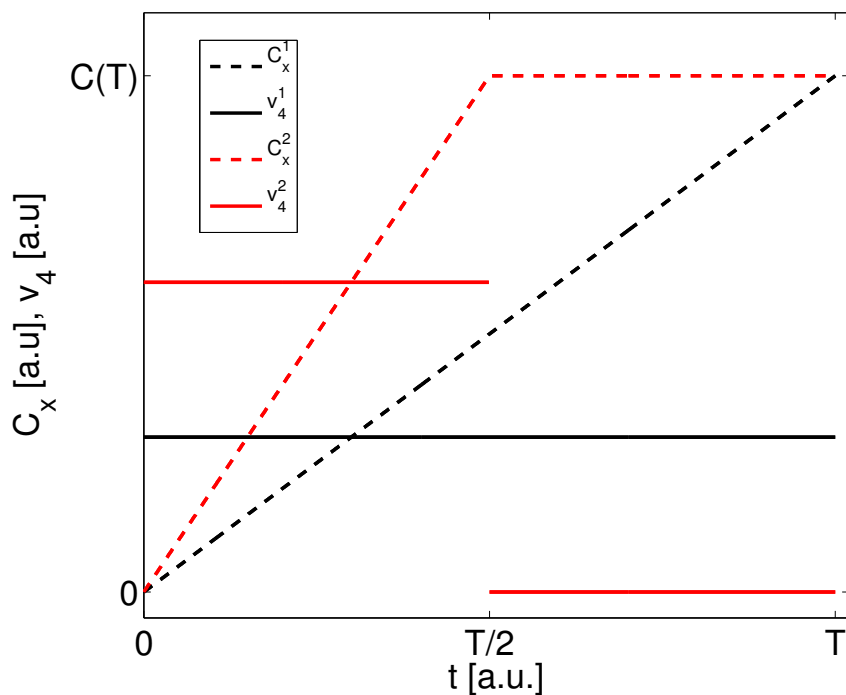


Abbildung 3.9: Die zwei Strategien der Zelle dargestellt an v_4 . Die Rate v_4^1 kann konstant sein, wodurch C^1 kontinuierlich produziert wird (Strategie 1, dargestellt in schwarz). Die zweite Strategie (in rot) besteht darin, dass die Rate v_4^2 doppelt so hoch ist wie v_4^1 , aber dafür nur für die Hälfte der Zeit aktiv ist. Die Menge an C , $C(T)$, die produziert wird, ist in beiden Fällen identisch.

3 Ursprung von Oszillationen in biochemischen Netzwerken

Strategie	R_x	C_x	D_x	v_0	v_1	v_2	v_3	v_4	v_5	v_6	v_7	v_8	$F_1 + F_2$
1	20	1.3	1.3	20	10	10	10	10	10	10	10	10	5
2	20	1.3	-	20	20	20	20	20	-	-	-	-	5
	20	-	1.3	20	-	-	-	-	20	20	20	20	5

Tabelle 3.3: Parameter und Flusswerte, die verwendet werden, um die beiden Strategien (Abbildung 3.9) hinsichtlich ihres Enzymbedarfs zu untersuchen. Alle Größen sind in beliebigen Einheiten angegeben. In Strategie 1 sind sämtliche Raten für ein Zeitintervall T aktiv; der Fluss v_0 teilt sich gleichmäßig auf beide Ketten auf. In Strategie 2 ist jede Kette jeweils nur $T/2$ lang aktiv. Die Summe von F_1 und F_2 ist auf den Wert 5 beschränkt.

Strategie	R	A_1	A_2	C	B_1	B_2	D	F_1	F_2
1	13.01	8.16	3.79	2.03	8.67	4.42	2.18	2.51	2.49
2	6.08	1.61	2.60	4.90	-	-	-	5.00	0.00
	6.08	-	-	-	1.61	2.60	4.90	0.00	5.00

Tabelle 3.4: Die optimalen Konzentrationen der Intermediate für beide untersuchte Strategien. Für Strategie 1 ist das Verhältnis von F_1 zu F_2 annähernd 1. Für Strategie 2 nehmen F_1 beziehungsweise F_2 den theoretisch möglichen Maximalwert/Minimalwert an, wenn sie als Substrat/Produkt auftreten.

in der zweiten Hälfte inaktiv ist, verhält es sich für v_8 genau umgekehrt.

Der Enzymbedarf wird nun - bei fixierten Werten für v_4 und v_8 - für beide Strategien minimiert. Die festgelegten Größen für eine dazu vorgenommene Beispielrechnung finden sich in Tabelle 3.3. Sämtliche Gleichungen sowie eine Beschreibung der aus [23] entlehnten Methode zur Berechnung des Enzymbedarfs finden sich im Anhang B (Abschnitt B.3).

Ergebnisse

Tabelle 3.4 zeigt die optimalen Konzentrationen für beide Strategien; Tabelle 3.5 den damit einhergehenden Enzymbedarf. Es zeigt sich, dass mit Strategie 2 zirka 30 Prozent weniger Enzym gegenüber Strategie 1 benötigt wird. Diese Ergebnisse beruhen in

Strategie	E_0	E_1	E_2	E_3	E_4	E_5	E_6	E_7	E_8	$\sum E_i$
1	97.36	45.07	77.80	90.71	59.18	52.04	91.70	74.61	51.09	639.55
2	38.93	38.93	55.67	60.43	39.97	-	-	-	-	233.92
	38.93	-	-	-	-	38.93	55.67	60.43	39.97	233.92

Tabelle 3.5: Die benötigte Menge an Enzymen für beide untersuchte Strategien. Alle Größen sind in beliebigen Einheiten angegeben. Der Enzymbedarf fällt für Strategie 2 wesentlich geringer aus als für Strategie 1.

3.4 Oszillationen stellen ein optimales Reaktionsmilieu ein

diesem Beispiel auf den thermodynamisch effizienteren Gradienten, die sich in Strategie 2 einstellen lassen. Während die Konzentrationen von F_1 und F_2 für Strategie 1 annähernd gleich sind, können sie im Falle von Strategie 2 jeweils ihren Optimalwert annehmen (Tabelle 3.4). Dies ist darauf zurückzuführen, dass sich im Falle von Strategie 2 das im Anhang B.3 angegebene System der thermodynamischen Beschränkungen (Gleichungen B.11) sich erheblich vereinfacht, da bei der Optimierung einer einzelnen Kette die Hälfte der thermodynamischen Beschränkungen irrelevant ist. Dadurch vergrößert sich der Lösungsraum für die einzelnen Konzentrationen erheblich, die Produkt- und Substratkonzentrationen können optimal gewählt werden, was den Bedarf an Enzym verringert.

3.4.3 Fazit

Über zwei Ansätze kann gezeigt werden, dass es für die Fitness der Zelle von Vorteil sein kann, Stoffwechselwege, die unterschiedliche Anforderungen an das Reaktionsmilieu besitzen, zu unterschiedlichen Zeiten zu aktivieren. Trotzdem die Stoffwechselwege in diesem Falle nicht dauerhaft aktiv sind, kann ein Fitnessvorteil generiert werden, da die Reaktionen jeweils unter den für sie optimalen Bedingungen ablaufen können. Das Ablaufenlassen von Einzelprozessen in den für sie optimalen Reaktionsmilieus kann also gegenüber der Optimierung des Gesamtprozesses Fitnessvorteile für die Zelle mit sich bringen.

Das Umschalten zwischen den Reaktionsmilieus ist diesen Modellen dabei nicht mit Kosten für die Zelle verbunden, was unter realistischen Bedingungen nicht der Fall ist, sondern stets mit Verbrauch von Ressourcen einhergeht. Fasst man das Modell sehr allgemein auf, könnte man F_1 und F_2 auch als unterschiedliche pH-Werte interpretieren, bei denen bestimmte Enzyme der unterschiedlichen Synthesewege ihr Aktivitätsoptimum aufweisen. Für das Umschalten zwischen zwei verschiedenen pH-Werten ist allerdings der Einsatz von energieverbrauchenden Protonenpumpen notwendig. Dies ließe sich in diesen Modellen berücksichtigen, indem man beispielsweise für das Umschalten eine bestimmte Menge an Ressource R aufzuwenden hat, oder dieses mit Verbrauch an Biomasse BM einhergeht. So könnte auch eine Schranke ermittelt werden, bis zu der sich das Umschalten für die Zelle noch auszahlt und ab der ein stationärer Zustand effizienter wäre.

3.5 Zusammenfassung und weiterführende Arbeiten

In diesem Kapitel sind vier verschiedene Szenarien dargelegt, die zu Oszillationen in biochemischen Netzwerken führen können.

Zum einen könnte es sich dabei um ein rein mechanistisches Phänomen handeln, das auf einer negativen Rückkopplung und einer systeminherenten Zeitverzögerung dieses Signals beruht und keinen unmittelbaren Vorteil für den Organismus mit sich bringt. Weiterhin könnten diese Dynamiken von intrinsischen Zyklen wie dem Zellzyklus herrühren. Dieser ist in verschiedene Phasen unterteilt, wobei die Übergänge zwischen den selbigen stark reguliert sind und dabei verschiedensten Anforderungen genügen müssen, was sich in den sich über den Zyklus hinweg ändernden physiologischen Profilen wiederfindet. Die Idee, dass die metabolischen Oszillationen, die man in Hefe beobachten kann, dazu dienen, die Unversehrtheit des Genoms zu gewährleisten, indem die Phase hoher respiratorischer Aktivität zeitlich von der Replikation der DNA getrennt wird [9, 54, 117], findet in den hier durchgeführten Simulationen Unterstützung. Für ein Minimalsystem, in dem ein solcher Konflikt abgebildet ist, wird mittels *in-silico* Evolution gezeigt, dass die Produktion von Biomasse die höchsten Werte erreicht, wenn die Produktion von toxischen Nebenprodukten von der Synthese der durch sie geschädigten Metabolite zeitlich getrennt wird. Die erhaltenen Lösungen sind demnach oszillatorischen Charakters. Diese ergeben sich auch, wenn ein Minimalsystem untersucht wird, das Stoffwechselwege, die unterschiedliche Anforderungen an das vorherrschende Reaktionsmilieu haben, aufweist. Zu beobachten ist dann ein Umschalten zwischen den Reaktionsmilieus. Trotzdem die Stoffwechselwege dann nur die Hälfte der Zeit aktiv sind, kann über eine solche zeitliche Kompartimentierung ein Fitnessvorteil generiert werden, da jeder der Stoffwechselwege unter optimierten Bedingungen abläuft.

Bezüglich der Simulationen, die auf *in-silico* Evolution beruhen (Abschnitte 3.3 und 3.4), ist anzumerken, dass die erhaltenen Oszillationen nicht von außen vorgegeben sind, sondern sich als optimale Lösung für den abgebildeten Konflikt ergeben. Nimmt man den Systemen die Möglichkeit Regulationsstrukturen zu etablieren, reduziert sich die Biomasseproduktion in erheblichen Maße.

Es ist davon auszugehen, dass es nicht nur einen Grund für die metabolischen Zyklen in Hefe gibt; vielmehr dürfte es sich um eine Überlagerung dieser hier aufgezeigten Szenarien handeln, die zu den beobachteten Phänomen führen. Ein nächster Schritt wäre nun, ein realistisches Modell mittels *in-silico* Evolution zu untersuchen, um mögliche Regulationsmechanismen zu detektieren. Ein solches Modell ist in Abbildung 3.10 dargestellt; die dazugehörigen Reaktionen und Nettogleichungen für die Biomassekomponenten finden sich in Anhang B im Abschnitt B.4. Mit diesem Modell ließe sich untersuchen, ob es nur aufgrund der unterschiedlichen Anforderungen einzelner Stoffwechselwege an das Reaktionsmilieu zu Oszillationen kommen kann und sich bereits publizierte Regulationsstrukturen [116, 131] finden lassen. Dieses Modell kann leicht um eine schädigende Komponente erweitert werden, indem man während der Respiration (Reaktion v_{20}) die Produktion von ROS mit berücksichtigt, die dann

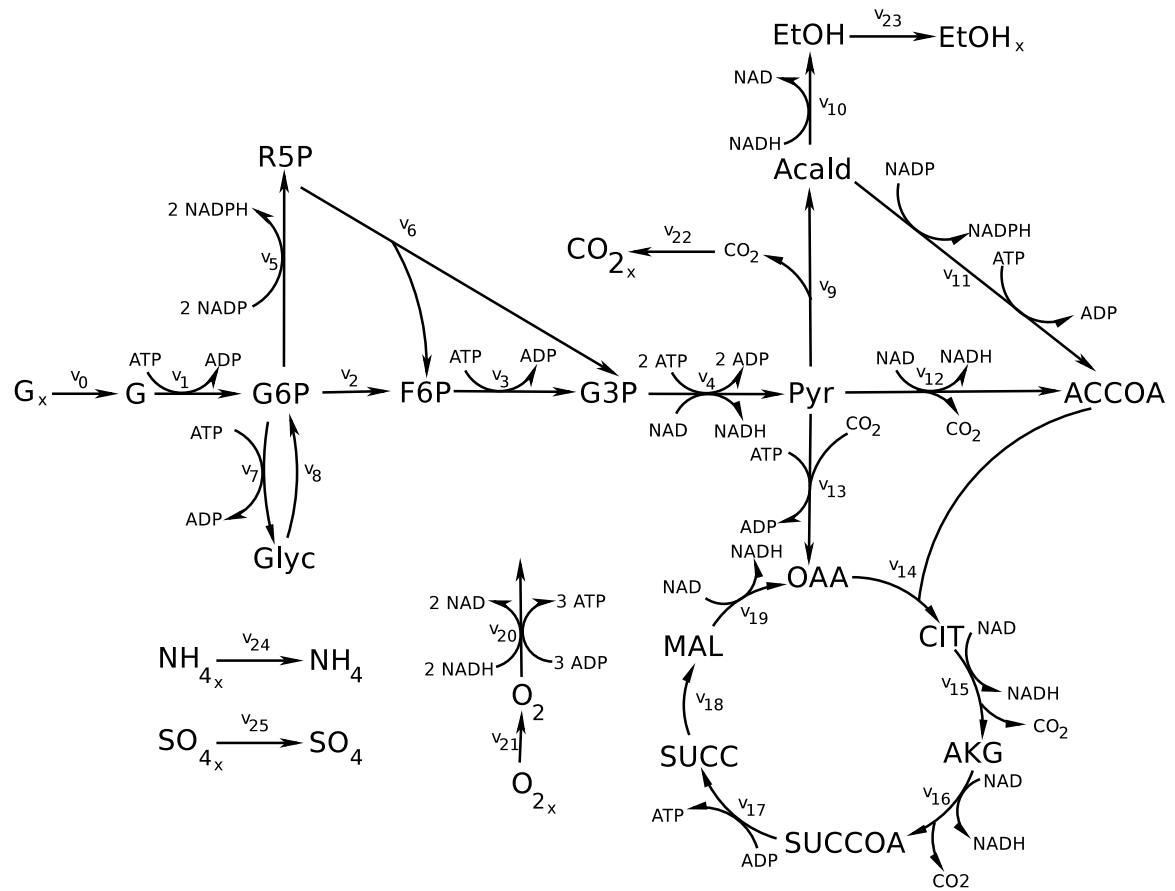


Abbildung 3.10: Modell des zentralen Hefestoffwechsels. Phosphate, Protonen und Ladungen sind in dem Schema nicht berücksichtigt. Als Reaktionsrichtung ist dabei diejenige angegeben, die für das Aufstelle der stöchiometrischen Matrix verwendet wird.

beispielsweise Lipide oder Biomasse abbauen. So könnten mehrere Szenarien innerhalb eines Modells untersucht werden und eine gegebenenfalls auftretende zeitliche Ordnung von Produktionsschritten mit den experimentell bestimmten (Abschnitt 2.1) verglichen werden.

4 Flussbilanzanalyse zu metabolischen Zyklen in Hefe

Aus den Simulationen des vorangegangenen Kapitels lässt sich unter anderem ableiten, dass es Vorteile für das Wachstum der Zelle mit sich bringen kann, wenn zwischen Stoffwechselwegen hin- und hergeschaltet wird, sie also zu unterschiedlichen Zeiten aktiv sind. Auf diese Weise kann die Wirkung toxischer Nebenprodukte minimiert werden und Reaktionen in dem für sie jeweils optimalen Reaktionsmilieu vonstatten gehen. In diesem Kapitel werden die aus dem in Abschnitt 2.1 beschriebenen Experiment gewonnenen Austauschraten für Glucose, Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid genutzt, um Erkenntnisse über interne Flussverteilungen und -änderungen zu gewinnen, die sich während der metabolischen Zyklen ergeben. Von diesen drei Austauschraten abgesehen, repräsentieren die in diesem Kapitel dargestellten Raten keine experimentell erhobenen, sondern sind Ergebnisse der Flussbilanzanalyse (FBA); deren Grundlagen sind in Abschnitt 4.1 dargelegt. Mit Hilfe von FBA wird untersucht, inwieweit gewisse Raten, wie die Wachstumsrate und die Produktionsraten einzelner Biomassekomponenten mit diesen Austauschraten in Verbindung stehen, was gegebenenfalls Rückschlüsse auf tatsächlich stattfindende Prozesse und eine zeitliche Ordnung von Syntheseschritten zulässt.

4.1 Grundlagen der Flussbilanzanalyse

Die Flussbilanzanalyse (FBA) erlaubt es Flusslösungen zu berechnen, die eine bestimmte Zielfunktion unter Berücksichtigung von Kapazitätsbeschränkungen von Enzymen und gemessene Flussverteilungen optimieren. Da FBA in den nachfolgenden Abschnitten von zentraler Bedeutung sein wird, werden an dieser Stelle die Grundlagen der Flussbilanzanalyse dargelegt. Orientiert wird sich dabei an [84].

Die Dynamik metabolischer Netzwerke kann folgendermaßen beschrieben werden:

$$\frac{d\mathbf{S}(t)}{dt} = \mathbf{N} \cdot \mathbf{v}(\mathbf{S}(t), \mathbf{p}). \quad (4.1)$$

Dabei repräsentiert \mathbf{S} einen Vektor, der die Konzentrationen der m Substrate enthält, \mathbf{v} ist ein Vektor mit n Ratengleichungen, \mathbf{p} ein Vektor der alle Parameter des System enthält und \mathbf{N} ist eine $m \times n$ Matrix, die so genannte *stöchiometrische Matrix*. Jede Spalte der Matrix korrespondiert zu einer Reaktion, wohingegen die Zeilen den Metaboliten zuzuordnen sind. Die Matrixeinträge, die *stöchiometrischen Faktoren*, sind

4 Flussbilanzanalyse zu metabolischen Zyklen in Hefe

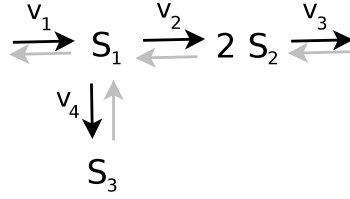


Abbildung 4.1: Schema eines Beispielsystems. Es ist leicht abgeändert übernommen aus [56]. S_1 , S_2 und S_3 sind Metabolite. Alle Reaktionen v_i sind reversibel, wobei die eigentliche Richtung des Flusses - die das Vorzeichen der stöchiometrischen Koeffizienten bestimmen - durch schwarze Pfeile markiert ist.

normalerweise ganzzahlig. Tritt ein Metabolit i in Reaktion j als Produkt/Substrat auf, so ist der stöchiometrische Koeffizient an der Position n_{ij} positiv/negativ. Der Betrag von n_{ij} gibt dabei die Zahl der Moleküle des Metaboliten an, die in der entsprechenden Reaktion umgesetzt werden. Abbildung 4.1 zeigt dafür ein kleines Beispielsystem; \mathbf{S} ist hierbei gegeben durch $\mathbf{S} = (S_1 \ S_2 \ S_3)^T$, \mathbf{v} durch $\mathbf{v} = (v_1 \ v_2 \ v_3 \ v_4)^T$ und \mathbf{N} ist

$$\mathbf{N} = \begin{pmatrix} 1 & -1 & 0 & -1 \\ 0 & 2 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}.$$

Ein System befindet sich im *stationären Zustand*, wenn

$$\frac{d\mathbf{S}(t)}{dt} = 0 = \mathbf{N} \cdot \mathbf{v}(\mathbf{S}^0, \mathbf{p}), \quad (4.2)$$

wobei der hochgestellte Index ‘0’ den stationären Zustand kennzeichnet. Löst man nun Gleichung 4.2, erhält man sämtliche Flussverteilungen, die im stationären Zustand möglich sind; diese Flussverteilungen werden auch *Flussmoden* genannt. Kann eine solche Flussmode nicht weiter in eine nichtnegative Linearkombination von Flussmoden zerlegt werden, spricht man von einer *elementaren Flussmode* [99].

Für gewöhnlich ist das sich daraus ergebende Gleichungssystem unterbestimmt, der Lösungsraum kann allerdings bei entsprechendem Wissen über das System weiter eingegrenzt werden, was über ein Beschränken der Raten v_i geschehen kann:

$$v_{imin} \leq v_i \leq v_{imax}. \quad (4.3)$$

Dabei repräsentieren v_{imin} die minimale und v_{imax} die maximale Raten von v_i , die sich aus Messungen der Raten, aus Annahmen zur Kapazität der die entsprechenden Reaktionen katalysierenden Enzyme und thermodynamischen Überlegungen ergeben. Ist Reaktion i beispielsweise irreversibel, ist v_i nach unten durch 0 beschränkt.

Derartige Annahmen können den ursprünglichen Lösungsraum erheblich verkleinern und erlauben dann ein effizientes Detektieren spezieller Flusslösungen, z.B. jener, die

die Wachstumsrate maximiert, oder auch die Produktionsrate eines bestimmten Metaboliten, wie z.B. *ATP*. Das sich ergebende Optimierungsproblem - die Zielfunktion ist durch v_{target} repräsentiert - lässt sich für ein solches Problem wie folgt zusammenfassen:

maximiere v_{target}
 mit den **Nebenbedingungen**
 $N \cdot v^0 = 0$ **und** $v_{imin} \leq v_i \leq v_{imax}$

Es handelt sich dabei um ein lineares Optimierungsproblem, das daher mittels linearer Programmierung gelöst werden kann. Diese Lösung wird in den seltensten Fällen eindeutig sein; um die alternativen Flussverteilungen zu erhalten, kann man eine Flussvariabilitätsanalyse [62, 90] durchführen. Dabei wird der zuvor erhaltene Wert für die Zielfunktion v_{target} als weitere Nebenbedingung hinzugefügt und anschließend jede Rate des Systems minimiert und auch maximiert, worüber sich Aussagen treffen lassen, wie variabel die jeweilige Reaktion ist, um den Optimalwert für die Zielfunktion zu erreichen. Maximiert man beispielsweise die Wachstumsrate eines Systems, das Glucose als einzige Kohlenstoffquelle aufweist, wird die Glucoseaufnahme stets maximal gewählt werden. Setzt man nun die Wachstumsrate auf den erhaltenen Wert fest und führt eine Flussvariabilitätsanalyse durch, so wird - falls Glucose die einzige Kohlenstoffquelle des Systems ist - diese Aufnahme keine Variabilität aufweisen: das Maximum der Aufnahme ist identisch mit deren Minimum. Jedoch kann es interessante Raten geben, die Variabilität aufweisen, was bedeutet, dass dieselbe Wachstumsrate über mehrere Flusslösungen realisiert werden kann.

Die Wachstumsrate in FBA-Modellen wird in der Regel als Linearkombination wichtiger Vorläufer für Biomasse dargestellt. Es handelt sich demnach um eine Hilfsfunktion, die das Wachstum des Systems abbilden soll. Wenn selbige maximiert wird, geschieht das allein aus stöchiometrischen Überlegungen heraus; die Wachstumsrate in FBA-Modellen stellt also keine kinetische Rate dar. Diese wichtige Unterscheidung ist beispielsweise im Kontext von *ATP*-Produktion diskutiert [86].

Dass sämtliche Rechnungen ausschließlich auf stöchiometrischen Gegebenheiten beruhen, ist zugleich ein großer Vorteil von FBA, da kein Wissen über Konzentrationen und kinetische Parameter - die oftmals nicht bekannt oder aber schwer zu beschaffen sind - nötig ist, um Flussverteilungen vorherzusagen. Jedoch ist es dadurch nicht möglich, dynamisches Verhalten und regulatorische Mechanismen in Netzwerken zu untersuchen. Weiterentwicklungen der hier beschriebenen "klassischen" FBA, die sich mit derartigen Problemen und anderen Fragestellungen auseinandersetzen, finden sich z.B. in [3, 11, 60, 68, 100, 134].

4.2 Verwendetes Modell

Gearbeitet wird mit dem Modell, das in [43] publiziert wurde und auf [16] basiert. Es umfasst 230 Reaktionen und 218 Metabolite und deckt den zentralen Kohlenstoffstoffwechsel ab: enthalten sind also Glykolyse, Gluconeogenese, der Pentose-Phosphat-

Weg, der Citratzyklus und oxidative Phosphorylierung; Speicher von Kohlenhydraten ist hingegen nicht berücksichtigt.

Es gibt zwei Kompartimente, das Cytosol und das Mitochondrium. Mit der Umwelt ausgetauscht werden können Glucose, Sauerstoff, Kohlenstoffdioxid, Wasser, Protonen, Ammonium, Sulfat und als weitere kohlenstoffhaltige Metabolite Acetat, Ethanol, Glycerol, Pyruvat und Succinat.

Die in Abschnitt 4.1 angesprochene Hilfsfunktion, die das Wachstum der Zelle widerspiegelt - im Modell "R_biomass" genannt - setzt sich wie folgt zusammen (die Abkürzungen sind im Abkürzungsverzeichnis angegeben):

R_biomass: $1.1348 \text{ 13DGlc} + 0.4588 \text{ Ala} + 0.046 \text{ AMP} + 0.1607 \text{ Arg} + 0.1017 \text{ Asn} + 0.2975 \text{ Asp} + 59.276 \text{ ATP} + 0.0447 \text{ CMP} + 0.0066 \text{ Cys} + 0.0036 \text{ dAMP} + 0.0024 \text{ dCMP} + 0.0024 \text{ dGMP} + 0.0036 \text{ dTMP} + 0.0007 \text{ Ergst} + 0.1054 \text{ Gln} + 0.3018 \text{ Glu} + 0.2904 \text{ Gly} + 0.046 \text{ GMP} + 59.276 \text{ H}_2\text{O} + 0.0663 \text{ His} + 0.1927 \text{ Ile} + 0.2964 \text{ Leu} + 0.2862 \text{ Lys} + 0.8079 \text{ Mannan} + 0.0507 \text{ Met} + 6e^{-06} \text{ Pa} + 6e^{-05} \text{ Pc} + 4.5e^{-05} \text{ Pe} + 0.1339 \text{ Phe} + 0.1647 \text{ Pro} + 1.7e^{-05} \text{ Ps} + 5.3e^{-05} \text{ Ptdlino} + 0.1854 \text{ Ser} + 0.02 \text{ SO}_4 + 0.1914 \text{ Thr} + 6.6e^{-05} \text{ Triglyc} + 0.0284 \text{ Trp} + 0.102 \text{ Tyr} + 0.0599 \text{ UMP} + 0.2646 \text{ Val} + 0.0015 \text{ Zymst} \rightarrow 59.276 \text{ ADP} + 58.7162 \text{ H} + 59.305 \text{ Pi}$

In diesem Modell sind Protonen nicht bilanziert, von einer Ausnahme abgesehen; dabei handelt es sich um die Protonen der Atmungskette, die nachfolgend als "Hcyt" bezeichnet werden.

4.3 Verwendete Software

Für die Durchführung von FBA stehen zahlreiche Anwendungen zur Verfügung [59]. In dieser Arbeit werden sämtliche Simulationen mit der frei verfügbaren Software FASIMU [39] in Kombination mit dem IBM ILOG CPLEX Optimierer¹ (Version 12.5.1) angefertigt.

4.4 Berechnung der Austauschraten

Die in diesem Kapitel durchgeführten Analysen mittels FBA beruhen alle auf drei Austauschraten, die nachfolgend berechnet sind. Es handelt sich dabei um die Glucoseaufnahmerate, die Sauerstoffaufnahmerate sowie die Kohlenstoffdioxidabgaberate des in Abschnitt 2.1 beschriebenen Experiments. Alle anderen hier in diesem Kapitel aufgeführten Raten sind über FBA bestimmte Raten und demnach nicht experimentell erhoben.

¹<http://www-01.ibm.com/software/commerce/optimization/cplex-optimizer/index.html>

4.4.1 Berechnung der Glucoseaufnahmerate

Die Verdünnungsrate, D , in dem untersuchten System beträgt $0.089h^{-1}$, im Medium befinden sich 20 g Glucose, G , pro Liter (Molekulargewicht, $M_{glc} = 180.16g \cdot mol^{-1}$), das Trockengewicht, B , beträgt 8.1 g pro Liter und der Fermenter hat ein Volumen, V , von 0.65 Liter. Gegeben diese Werte kann man die Glucoseaufnahmerate, q_{Glc} , in den Fermenter berechnen:

$$q_{Glc} = D \cdot V \cdot \frac{G}{M_{glc}}. \quad (4.4)$$

Einsetzen der oben genannten Werte ergibt:

$$q_{Glc} = 0.089 \cdot 0.65 \cdot \frac{20}{180.16} \frac{mol}{h} = 6.422 \frac{mmol}{h}. \quad (4.5)$$

Diese Rate wird nun noch bezüglich des Trockengewichts normalisiert und man erhält die endgültige Glucoseaufnahmerate:

$$q_{Glc} = \frac{6.422}{8.1 \cdot 0.65} \frac{mmol}{h \cdot g} \approx 1.22 \frac{mmol}{h \cdot g}. \quad (4.6)$$

4.4.2 Berechnung der Sauerstoffaufnahme- und der Kohlenstoffdioxidabgaberate

Im Folgenden werden die Sauerstoffaufnahmerate und die Kohlenstoffdioxidabgaberate berechnet basierend auf dem in Abschnitt 2.1 beschriebenen Experiment. Abbildung 4.2(a) zeigt die Zeitreihe für Sauerstoff im Abgas und dessen Phasenbeziehung zum gelöstem Sauerstoff im Medium.

Die Maxima beider Kurven sollten übereinanderliegen, man kann jedoch eine Phasenverschiebung beobachten. Das ist darauf zurückzuführen, dass es eine technisch bedingte Verzögerung zwischen dem Verbrauch des Gases im Fermenter und dessen Detektion gibt. Diese Verzögerung beträgt ungefähr 13 Minuten und ändert nicht nur die Phasenbeziehung zum gelösten Sauerstoff, sondern verkleinert auch die Amplitude des Signals. Um beide Effekte zu korrigieren, wird eine lineare Näherung genutzt, die die Beziehung zwischen dem tatsächlichen und dem gemessenen Signal beschreibt [79, 129]:

$$\frac{dC_{gem}}{dt} = \frac{1}{\tau} \cdot (C_{tat} - C_{gem}), \quad (4.7)$$

wobei τ die zeitliche Verzögerung repräsentiert (hier beträgt τ ungefähr 13 Minuten), C_{gem} die gemessene und C_{tat} die eigentliche Konzentration.

Einfaches Umformen der Gleichung ergibt

$$C_{tat} = \tau \cdot \frac{dC_{gem}}{dt} + C_{gem}, \quad (4.8)$$

4 Flussbilanzanalyse zu metabolischen Zyklen in Hefe

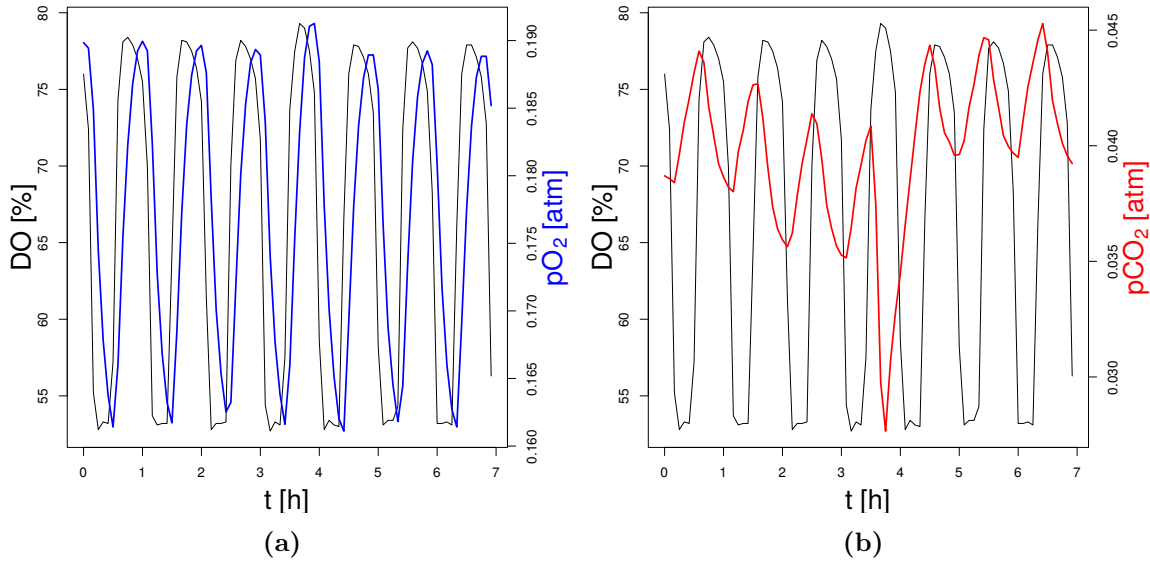


Abbildung 4.2: Die gemessenen Konzentrationen im Abgas und deren Phasenbeziehung zum gelösten Sauerstoff im Medium. Teilabbildung (a) zeigt den gemessenen Zeitverlauf für Sauerstoff im Abgas, Teilabbildung (b) den für Kohlenstoffdioxid und jeweils deren Phasenbeziehung zum gelösten Sauerstoff im Medium. Die Zeitreihen für Sauerstoff und gelösten Sauerstoff zeigen eine Phasendifferenz (Teilabbildung (a)), die auf einer Verzögerung zwischen dem Verbrauch des Gases im Fermenter und dessen Detektion beruht. Die abfallende Amplitude für den Zeitverlauf von Kohlenstoffdioxid ist auf die Markierung mit ¹³C-Isotopen zu erklären. Der drastische Abfall nach zirka 3.7 Stunden ist auf eine kurze Hungerphase beim Umschalten auf Nährmedium mit unmarkierter Glucose und der damit einhergehenden Verringerung der respiratorischen Aktivität zurückzuführen.

und erlaubt die Berechnung der tatsächlichen Gaskonzentrationen innerhalb des Fermenters basierend auf den gemessenen.

Abbildungen 4.3(a) und 4.3(b) zeigen sowohl die nicht korrigierten als auch die korrigierten Zeitverläufe für Sauerstoff beziehungsweise Kohlenstoffdioxid. Wie man erkennen kann, führt die Anwendung von Gleichung 4.8 sowohl zu einer Vergrößerung der Amplitude als auch zu der gewünschten Phasenbeziehung zwischen Sauerstoff im Abgas und dem gelösten Sauerstoff im Medium (Abbildung 4.4(a)). Basierend auf diesen korrigierten Zeitverläufen für die Abgase lassen sich nun die Sauerstoffaufnahme- und die Kohlenstoffdioxidabgaberate berechnen. Die entsprechenden Gleichungen,

$$q_{O_2} = \frac{F_{in}}{R \cdot T \cdot V_R} \cdot \left(P_{O_{2in}} - P_{O_{2out}} \cdot \left(\frac{1 - P_{O_{2in}}}{1 - (P_{O_{2out}} + P_{CO_{2out}} + P_{H_2S})} \right) \right) \quad (4.9)$$

$$q_{CO_2} = \frac{F_{in}}{R \cdot T \cdot V_R} \cdot \left(P_{CO_{2out}} \cdot \left(\frac{1 - P_{O_{2in}}}{1 - (P_{O_{2out}} + P_{CO_{2out}} + P_{H_2S})} \right) - P_{CO_{2in}} \right) \quad (4.10)$$

4.4 Berechnung der Austauschraten

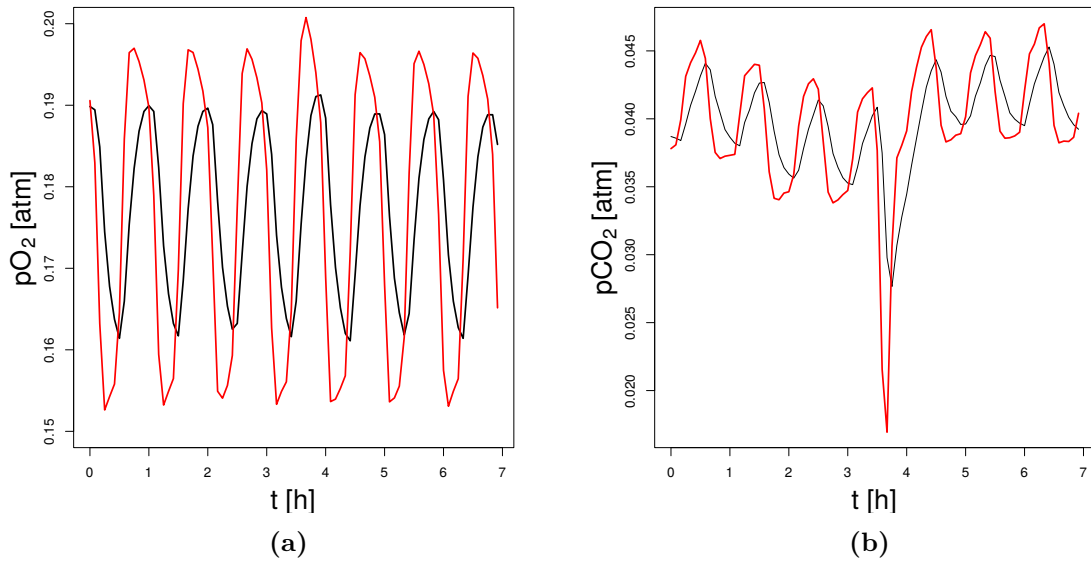


Abbildung 4.3: Die modifizierten Zeitverläufe der Konzentration im Abgas. Teilabbildung (a) zeigt die Zeitreihen für Sauerstoff im Abgas (schwarz: gemessen, rot: korrigiert mittels Gleichung 4.8). Teilabbildung (b) zeigt dasselbe für Kohlenstoffdioxid.

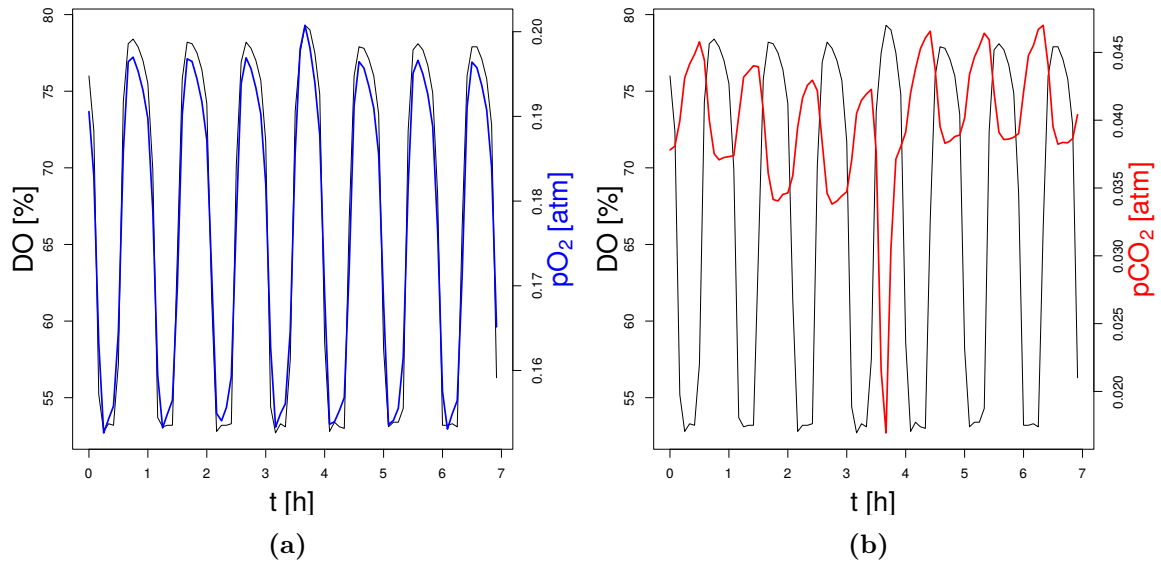


Abbildung 4.4: Die gemessenen Konzentration im Abgas und deren Phasenbeziehung zum gelösten Sauerstoff im Medium. Diese Abbildungen sind analog zu Abbildungen 4.2(a) und 4.2(b), aber nun mit den über Gleichung 4.8 korrigierten Zeitverläufen für die jeweiligen Abgase.

4 Flussbilanzanalyse zu metabolischen Zyklen in Hefe

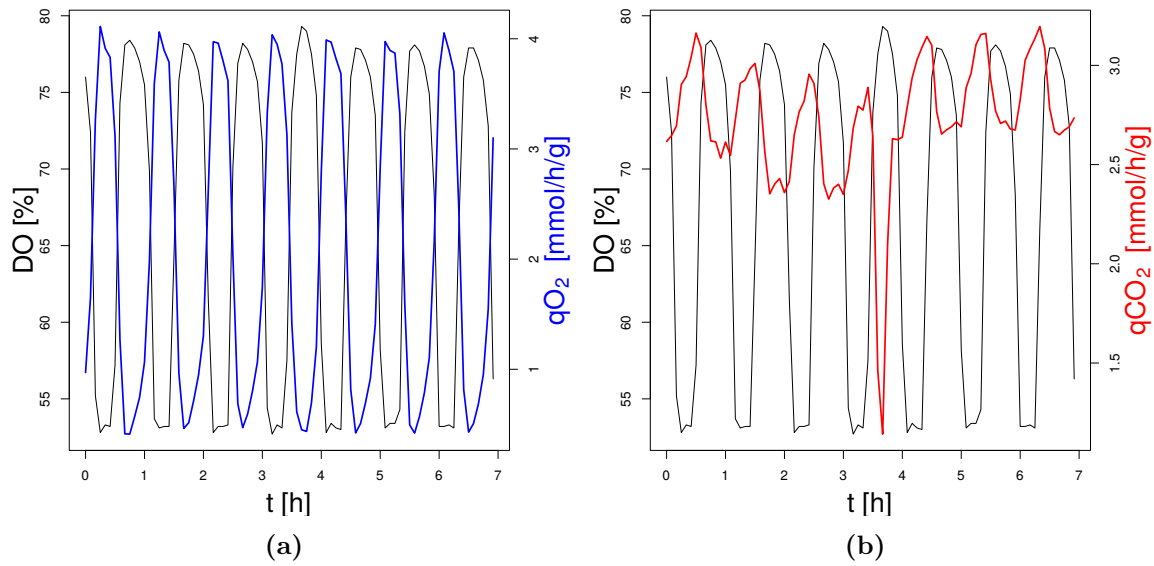


Abbildung 4.5: Austauschraten und deren Phasenbeziehung zum gelösten Sauerstoff im Medium. Teilabbildung (a) zeigt die Sauerstoffaufnahme, Teilabbildung (b) die Produktionsrate für Kohlenstoffdioxid in Beziehung zum gelösten Sauerstoff im Medium. Bei steigender/sinkender respiratorischer Aktivität sinkt/steigt die Konzentration an gelöstem Sauerstoff im Medium.

sind [77] entnommen. R ist die Gaskonstante mit $R = 0.0820575 \frac{\text{l} \cdot \text{atm}}{\text{K} \cdot \text{mol}}$, V_R das Reaktorvolumen, $V_R = 650 \text{ ml}$, F_{in} die Gaseinstromrate von $150 \frac{\text{ml}}{\text{min}}$, T die Temperatur der Kultur von 30 Grad Celsius.

Die sich daraus ergebenden Raten sind in den Abbildungen 4.5(a) und 4.5(b) dargestellt. Das Abfallen der Amplitude für Kohlenstoffdioxid ist auf die einsetzende Markierung von Kohlenstoffdioxid durch ^{13}C zurückzuführen; das starke Absinken bei ungefähr 3.7 Stunden auf eine kurze Hungerphase, die in einer Verminderung der respiratorischen Aktivität resultiert. Abbildung 4.6(a) zeigt die Phasenbeziehungen vom gelösten Sauerstoff im Medium zu Sauerstoffaufnahme- und Kohlenstoffdioxidproduktionsrate. In Übereinstimmung mit anderen Arbeiten [52] ist das Maximum der Kohlenstoffproduktionsrate leicht gegenüber dem Maximum der Sauerstoffaufnahme verschoben. Auch die Werte der Raten befinden sich in einem vergleichbarem Bereich. Aufgrund dieses Phasenunterschiedes lässt sich auch eine Oszillation des respiratorischen Quotienten verzeichnen, die in Abbildung 4.6(b) dargestellt ist.

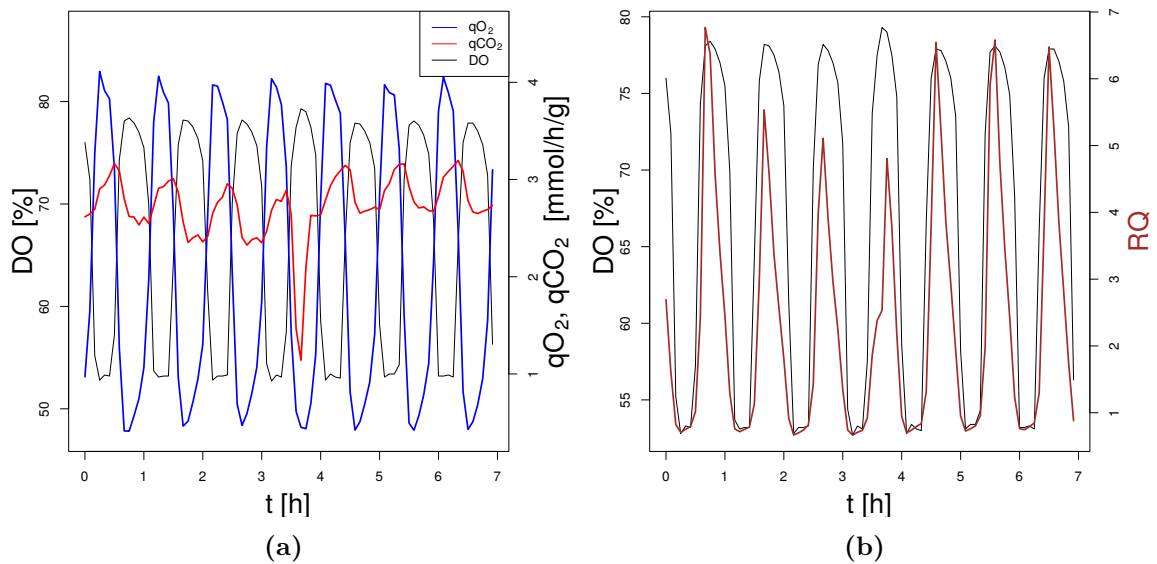


Abbildung 4.6: Teilabbildung (a) zeigt die Phasenbeziehungen von gelöstem Sauerstoff im Medium, der Sauerstoffaufnahme- und Kohlenstoffdioxidproduktionsrate. Teilabbildung (b) zeigt den sich daraus ergebenden respiratorischen Quotienten.

4.5 Wachstumsrate im Chemostat - Modell und Experiment

In diesem Abschnitt soll mittels FBA untersucht werden, wie die Wachstumsrate der Zellen im Chemostat von den in den letzten Abschnitten berechneten Austauschraten abhängt. Dafür ist es notwendig, die Zusammenhänge zwischen der im Modell verwendeten Wachstumsrate, der Wachstumsrate der im Chemostat befindlichen Spezies und der Verdünnungsrate zu kennen, der nachfolgend dargelegt ist. Die mathematische Darstellung orientiert sich stark an [14].

4.5.1 Zusammenhang zwischen Verdünnungsrate und Wachstumsrate im Chemostat

Im Allgemeinen kann die zeitliche Änderung einer Masse m innerhalb eines Systems wie folgt beschrieben werden:

$$\frac{dm}{dt} = m_{in} + m_{gen} - m_{out} - m_{cons}, \quad (4.11)$$

wobei m_{in} den Massefluss in das System beschreibt, m_{gen} die Generierung der Masse innerhalb des Systems, m_{out} denjenigen Massefluss, der das System verlässt und m_{cons} steht für die Verbrauchsrate der Masse, die innerhalb des System konsumiert wird. Betrachtet man nun die Änderung der Biomasse m_{BM} in einem Chemostat, sehen die einzelnen Terme von Gleichung 4.11 wie folgt aus:

$$\frac{dm_{BM}}{dt} = F \cdot X_{in} + \mu \cdot X \cdot V - F \cdot X - k_d \cdot X \cdot V, \quad (4.12)$$

wobei F die Rate des Masseeinfusses ist, X_{in} die Zellkonzentration im Nährmedium, μ ist die Wachstumsrate der Spezies X , X die Zellkonzentration im Fermenter, V das Volumen der flüssigen Phase im Fermenter und k_d ist die Sterberate von Spezies X . Im stationären Zustand kann Gleichung 4.12 gleich 0 gesetzt werden. Weiterhin kann man annehmen, dass X_{in} 0 ist, da der Masseeinfuss mittels einer sterilen Apparatur erfolgt und daher keine Zellen in den Fermenter gelangen. Die Sterberate k_d ist zudem sehr viel kleiner als die Wachstumsrate, so dass der entsprechende Term ebenfalls vernachlässigt werden kann.

Die sich aus diesen Annahmen heraus vereinfachte Gleichung 4.12 sieht dann wie folgt aus:

$$0 = \mu \cdot X \cdot V - F \cdot X. \quad (4.13)$$

Da X in unserem Falle stets größer als 0 ist, kann durch X dividiert werden und man erhält für die Wachstumsrate folgenden Ausdruck:

$$\mu = \frac{F}{V}. \quad (4.14)$$

4.5 Wachstumsrate im Chemostat - Modell und Experiment

Das Verhältnis $\frac{F}{V}$ ist definiert als die Verdünnungsrate D was einen wichtigen Zusammenhang zwischen Wachstums- und Verdünnungsrate in einer kontinuierlichen Kultur ergibt:

$$\mu = D. \quad (4.15)$$

Dies ist eine der zentralen Gleichungen im Chemostat, die erstmals [75] beschrieben wurde. Der Experimentator kann also über eine entsprechende Verdünnungsrate die gewünschte Wachstumsrate einstellen, die verständlicherweise nicht oberhalb der maximalen Wachstumsrate der Spezies X liegen darf.

Für alle nachfolgenden Simulationen wird stets angenommen, dass die im Experiment verwendete Verdünnungsrate der Wachstumsrate der verwendeten Hefespezies im Chemostat entspricht und durch die im in Abschnitt 4.2 genannte Wachstumsrate des Modells abgebildet werden kann.

Weitere nützliche Gleichungen und Beziehungen, die für eine Kultur im Chemostat gelten, aber für diese hier vorgenommenen Analysen nicht von unmittelbarer Relevanz sind, lassen sich beispielsweise in [14] finden.

4.5.2 Wachstumsrate für gemittelte Austauschraten

Zunächst soll getestet werden, ob mit Hilfe des in Abschnitt 4.2 angegebenen Modells eine Wachstumsrate vorhergesagt werden kann, die im Bereich der experimentell festgelegten liegt und die Abhängigkeit selbiger von den Austauschraten untersucht werden.

Für Einzeller ist die Wachstumsrate eine sinnvolle Zielfunktion [24, 40], so dass diese hier mittels FBA maximiert wird. Aus den in Kapitel 4.4.2 bestimmten dynamischen Raten werden für den ersten Zyklus die Durchschnittsraten für Sauerstoffaufnahme und Kohlenstoffdioxidproduktion errechnet; die Glucoseaufnahme wird über einen Zyklus hinweg als konstant angenommen und ist in Kapitel 4.4.1 berechnet, wo auch die Verdünnungsrate D beziehungsweise die Wachstumsrate μ angegeben ist:

$$q_{Glc} = 1.220 \frac{mmol}{h \cdot g} \quad (4.16a)$$

$$q_{O_{2av}} = 2.044 \frac{mmol}{h \cdot g} \quad (4.16b)$$

$$q_{CO_{2av}} = 2.805 \frac{mmol}{h \cdot g} \quad (4.16c)$$

$$\mu = 0.089 \frac{1}{h} \quad (4.16d)$$

Betrachtet werden nun vier verschiedene Fälle, um die Abhängigkeit der Wachstumsrate von den einzelnen mittleren Austauschraten zu untersuchen; die Ergebnisse sind in Tabelle 4.1 zusammenfassend dargestellt.

Fall 1: Beschränkung der Glucoseaufnahme

Zunächst wird lediglich die Glucoseaufnahme beschränkt.

Die sich daraus ergebende Sauerstoffaufnahme liegt 30 Prozent oberhalb der experimentell bestimmten Rate und die Kohlenstoffdioxidabgaberate 4 Prozent unter der gemessenen. Der aufgenommene Sauerstoff wird dabei zu 99.6 Prozent für die Erzeugung von Energie in Form von *ATP* verwendet, die verbleibenden 0.4 Prozent werden für die Biosynthese von verschiedenen Biomassekomponenten benötigt, wie zum Beispiel für UMP, Ergosterol, Zymosterol und Triglyceride.

Der über Glucose aufgenommene Kohlenstoff wird lediglich in Form von Kohlenstoffdioxid, das während der Atmung gebildet wird, exportiert und ansonsten für Wachstum verwendet, so dass die Wachstumsrate 65 Prozent über der erwarteten liegt, da dies die effizienteste Verwertung von Glucose darstellt.

Es wird der Maximalwert für die Glucoseaufnahme erzielt. Das überrascht nicht, da Glucose die einzige Kohlenstoffquelle des Systems ist und aus dieser Biomassekomponenten synthetisiert werden.

Fall 2: Beschränkung der Glucose- und Sauerstoffaufnahme

Im zweiten Fall wird getestet, inwieweit sich eine Limitierung der Glucose- und Sauerstoffaufnahme auswirkt.

Die berechnete Wachstumsrate liegt nun noch 35 Prozent über der erwarteten, was deutlich weniger ist als im ersten Fall. Zu beobachten ist ein Export von Ethanol, der der Regeneration von NAD^+ dient: *NADH* wird hauptsächlich im Citratzyklus und der Glykolyse gebildet und anschließend in der Atmungskette für die *ATP*-Erzeugung genutzt unter Verwendung von Sauerstoff als Elektronenrezeptor. Ist das System nun bezüglich Sauerstoff limitiert, kann die Regeneration von NAD^+ nicht mehr in ausreichendem Maße in der Atmungskette erfolgen. Diese wird dann durch die Produktion von Ethanol aus Acetaldehyd gewährleistet, die *NADH* erfordert. Das entstehende Ethanol wird exportiert, was eine ineffizientere Verwertung von Glucose darstellt und die gegenüber dem ersten Fall verminderte Wachstumsrate erklärt ($0.120h^{-1}$ anstatt $0.147h^{-1}$).

Fall 3: Beschränkung der Glucoseaufnahme- und Kohlenstoffdioxidproduktionsrate

Im dritten Fall werden die Glucoseaufnahme und Abgabe von Kohlenstoffdioxid festgesetzt; die Aufnahme von Sauerstoff ist nun hingegen wieder unbegrenzt.

Damit einher geht eine um 35 Prozent gegenüber dem Experiment erhöhte Sauerstoffaufnahme und eine Wachstumsrate, die um 61 Prozent über dem erwarteten Wert liegt. Ethanol wird nicht exportiert, jedoch ist nun der basale Verbrauch von *ATP* ungleich 0; es kann also mehr *ATP* produziert werden, als es für das Wachstum notwendig wäre. Die berechneten Raten für die Sauerstoffaufnahme und für das Wachstum sind in einem ähnlichen Bereich wie im ersten Fall.

Dass die Wachstumsrate dennoch leicht unter der im ersten Fall berechneten liegt,

4.5 Wachstumsrate im Chemostat - Modell und Experiment

Beschränkungen	q_{Glc}	q_{O_2}	q_{CO_2}	q_{EtOH}	q_{ATPS}	μ
-1.22 < q_{Glc} < Inf -Inf < q_{O_2} < Inf 0 < q_{CO_2} < Inf	-1.22 (1)	-2.655 (1.3)	2.701 (0.96)	0	0	0.147 (1.65)
-1.22 < q_{Glc} < Inf -2.044 < q_{O_2} < Inf 0 < q_{CO_2} < Inf	-1.22 (1)	-2.044 (1)	2.566 (0.91)	0.484	0	0.120 (1.35)
-1.22 < q_{Glc} < Inf -Inf < q_{O_2} < Inf $q_{CO_2} = 2.805$	-1.22 (1)	-2.760 (1.35)	2.805 (1)	0	0 - 0.605	0.143 (1.61)
-1.22 < q_{Glc} < Inf $q_{O_2} = -2.044$ $q_{CO_2} = 2.805$	-1.22 (1)	-2.044 (1)	2.805 (1)	0.730	0 - 1.789	0.096 (1.09)

Tabelle 4.1: Die über FBA berechneten Austausch- und Wachstumsraten. Die Wachstumsrate μ hat die Einheit h^{-1} , alle anderen Raten haben die Einheit $\frac{mmol}{h \cdot g}$. Negative Raten sind Aufnahme-, positive Abgaberaten; q_{ATPS} steht dabei für den basalen Verbrauch an ATP und ist in allen Simulationen unbeschränkt, wie auch die Rate für Ethanolexport, q_{EtOH} . Wo dies möglich ist, werden die Raten ins Verhältnis zu den experimentell bestimmten gesetzt; das Verhältnis ist in runden Klammern hinter der jeweiligen Rate angegeben. Angegebene Intervalle repräsentieren das Ergebnis der Flussvariabilitätsanalyse; ist nur ein Wert angegeben, gibt es keine Variabilität für die entsprechende Rate.

ist darauf zurückzuführen, dass Glucose nicht mehr ausschließlich für Wachstum, sondern auch für die zusätzliche Kohlenstoffdioxidproduktion - diese ist im ersten Fall unbegrenzt - verwendet werden muss.

Fall 4: Beschränkung der Glucose- und Sauerstoffaufnahme sowie der Kohlenstoffdioxidproduktionsrate

Im vierten Fall werden alle Raten auf die im Experiment bestimmten Durchschnittsraten festgesetzt.

Die dabei erhaltene Wachstumsrate liegt 9 Prozent über der erwarteten. Es lässt sich ein Export von Kohlenstoff in Form von Ethanol feststellen, der auch im Experiment gegeben ist [52, 97]. Es kann wie in Fall 3 ATP erzeugt werden, das nicht für Wachstum benötigt wird.

Warum wird die Wachstumsrate durch FBA überschätzt?

In allen vier Fällen liegt die berechnete Wachstumsrate - zum Teil deutlich - über der aus dem Experiment erwarteten ($\mu = 0.089h^{-1}$), was den starken Einfluss der Austauschraten - insbesondere den der Sauerstoffaufnahme - verdeutlicht. Selbst wenn alle Austauschraten auf die experimentell bestimmten fixiert sind, erhält man eine Wachstumsrate, die um zirka 9 Prozent über der erwarteten liegt. Das kann

4 Flussbilanzanalyse zu metabolischen Zyklen in Hefe

mehrere Ursachen haben, näher untersucht werden hier zwei.

Zum einen kann die tatsächliche Zelle ATP nicht ausschließlich zur Produktion von Biomasse verwenden, sondern hat auch einen gewissen basalen Verbrauch an ATP , der zum Beispiel auf die Aufrechterhaltung von Protonengradienten an Membranen und auch auf Zellmembran- und DNA-Reparaturmechanismen zurückzuführen ist. Dieser basale Verbrauch an ATP , der nicht unmittelbar an Wachstumsprozesse gebunden ist, ist auch im Modell in Form einer zusammengefassten Reaktion enthalten und wird bei der Optimierung auf Biomasse in den Fällen 1 und 2 auf 0 gesetzt, was zwar die optimale Lösung für das Optimierungsproblem darstellt, aber biologisch nicht plausibel ist.

In den Fällen 3 und 4 kann dieser basale ATP -Verbrauch auch von 0 abweichen, ohne dass damit eine Verminderung der Wachstumsrate einherginge. Experimentell ist dieser Verbrauch nur schwer zugänglich und wird bei derlei Optimierungsprozessen zumeist unterschätzt, da die oben genannten ATP -verbrauchenden Prozesse in Modellen nur unzureichend Berücksichtigung finden. Daher ist dieser Verbrauch ein freier Parameter, über den sich die Wachstumsrate entsprechend anpassen lässt. Diese Abhängigkeit der Wachstumsrate von $qATPS$ - dem basalen Verbrauch von ATP - wird nachfolgend untersucht; der Zusammenhang ist in Abbildung 4.7 dargestellt. Dabei wird die Wachstumsrate in Abhängigkeit von $qATPS$ mit den in Fall 4 verwendeten Austauschraten optimiert. Wie bereits aus Tabelle 4.1 ersichtlich ist, hat $qATPS$ keinen Einfluss auf die Wachstumsrate bis zu einem Wert von zirka $1.8 \frac{mmol}{h \cdot g}$. Gegeben die festgelegten Austauschraten kann also mehr ATP produziert werden, als es für das Wachstum vonnöten wäre. Bei weiterer Steigerung von $qATPS$ verringert sich die Wachstumsrate, da das dabei verbrauchte ATP nicht mehr für Biosynthese verwendet werden kann, was mit einer Erhöhung der Ethanolausschüttung einhergeht. Die experimentell festgelegte Wachstumsrate wird für einen basalen Verbrauch von $qATPS \approx 2.4 \frac{mmol}{h \cdot g}$ erreicht.

Die zweite Ursache, warum die Wachstumsrate im Experiment kleiner ist als die, die man in dieser Simulation erhält, ist, dass keine Exportrate für andere kohlenstoffhaltigen Metabolite festgelegt wurde. Es ist bekannt, dass beispielsweise auch Acetat abgegeben wird [97], was in diesen Simulationen unberücksichtigt bleibt, da keine gemessenen Daten dafür vorliegen und die Exportrate dadurch nicht sinnvoll beschränkt werden kann. Legte man eine Exportrate für Acetat fest, so könnte die dafür benötigte Menge an Ressourcen nicht mehr für Wachstum verwendet werden, was eine Verringerung der Wachstumsrate zur Folge hätte.

Warum kommt es zum Export von Ethanol?

In den Fällen zwei und vier ist ein Export von Ethanol zu verzeichnen. Die Produktion von Ethanol ist die gegenüber der Respiration stöchiometrisch ineffizientere Variante, da pro Mol Glucose lediglich zwei Mol ATP generiert werden. Warum also kommt es zu dieser ineffizienten Verwertung von Glucose in Form von Ethanolproduktion und -export?

4.5 Wachstumsrate im Chemostat - Modell und Experiment

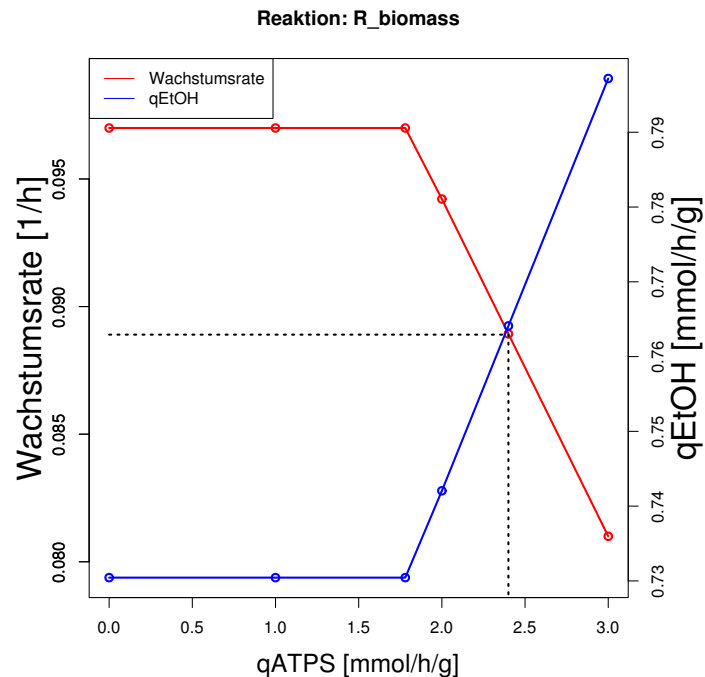


Abbildung 4.7: Optimale Wachstumsrate und der damit einhergehende Ethanolexport in Abhängigkeit vom basalen Verbrauch von ATP , $qATPS$. Die Sauerstoffaufnahme ist jeweils auf $2.044 \frac{mmol}{h \cdot g}$ und die Kohlenstoffdioxidproduktionsrate auf $2.805 \frac{mmol}{h \cdot g}$ festgesetzt. Die im Experiment bestimmte Wachstumsrate von $0.089 h^{-1}$ wird für $qATPS \approx 2.4 \frac{mmol}{h \cdot g}$ erreicht (mittels schwarzer gestrichelter Linie markiert).

Die Erklärung hierfür ist die Notwendigkeit der Regenerierung von NAD^+ . Abbildung 4.8 zeigt die wichtigsten Stoffwechselwege, an denen $NADH$ teilnimmt. Unter aeroben Bedingungen wird das in der Glykolyse und im Citratzyklus erzeugte $NADH$ in der Atmungskette als Elektronendonator für die Erzeugung von ATP verwendet. Der finale Elektronenakzeptor ist dabei Sauerstoff. Wenn nun das System bezüglich Sauerstoff limitiert ist - wie dies in den Szenarien zwei und vier der Fall ist - kann nicht mehr im ausreichendem Maße NAD^+ über die Atmungskette regeneriert werden, was dann mittels Fermentation - der Erzeugung von Ethanol - geschieht. Die Erzeugung von Ethanol ist dabei hefespezifisch. In anderen Organismen, wie dem Menschen, gibt es einen analogen Prozess, bei dem allerdings Milchsäure statt Ethanol entsteht.

4.5.3 Abhängigkeit der Wachstumsrate von dynamischen Austauschflüssen über einen Zyklus

Wie im vorangegangenen Abschnitt gezeigt, ist die über FBA erzielte Wachstumsrate in sehr guter Übereinstimmung mit der experimentellen, wenn die Durchschnittsraten über einen Zyklus als Beschränkungen gewählt werden und die Wachstumsrate maximiert wird.

4 Flussbilanzanalyse zu metabolischen Zyklen in Hefe

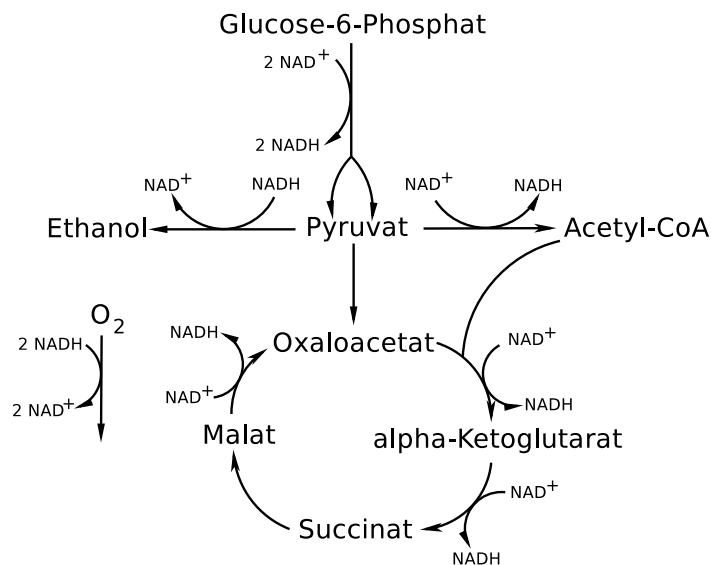


Abbildung 4.8: Die wesentlichen Stoffwechselwege - stark zusammengefasst dargestellt - in denen $NADH$ produziert und verbraucht wird. Es wird hauptsächlich in der Glykolyse und im Citratzyklus gebildet und steht in der Atmungskette als Elektronendonator zur Verfügung; Sauerstoff stellt dabei den finalen Elektronenakzeptor dar. Unter Sauerstoffmangel erfolgt die Regeneration von NAD^+ in Hefe unter Bildung von Ethanol.

In diesem Abschnitt wird nun näher untersucht, inwieweit die Wachstumsrate von den zeitaufgelösten Austauschraten abhängt. Dabei wird in den ersten zwölf Zeitpunkten des Experiments (siehe Abbildung 2.2) das System jeweils mit den gemessenen Raten für Sauerstoffaufnahme und Kohlenstoffdioxidproduktion beschränkt und anschließend die Produktion von Biomasse maximiert. Die Beschränkung besteht darin, dass die entsprechenden Austauschraten auf einen bestimmten Wert festgesetzt werden, was impliziert, dass die Zelle in jedem Punkt des Zyklus eine bestimmte Menge an Glucose und Sauerstoff aufnehmen und umsetzen sowie gleichzeitig eine bestimmte Menge an Kohlenstoffdioxid produzieren muss.

Die Abhängigkeit der Wachstumsrate von der Sauerstoffaufnahme- und Kohlenstoffdioxidproduktionsrate ist in Abbildung 4.9(a) dargestellt, die damit einhergehenden Austauschflüsse in Abbildung 4.9(b). In insgesamt vier der zwölf Zeitpunkte kann aufgrund der gewählten Beschränkungen für die Austauschraten keine gültige Lösung berechnet werden: in den Punkten vier bis sechs und im Messpunkt neun. Während die ersten drei Punkte jeweils mit hoher Sauerstoffaufnahme assoziiert sind, ist der vierte Punkt bei minimaler Sauerstoffaufnahme zu finden. Die Zeitverläufe der für die Biosynthese notwendigen externen Stoffe, wie Ammonium und Sulfat, folgen dabei dem Zeitverlauf der Wachstumsrate (Abbildung 4.9(b)). Wenn das System hinsichtlich Sauerstoff limitiert ist, ist ein Export von Ethanol zu beobachten, was charakteristisch für Hefe ist und auch experimentell beobachtet wird [52, 97]; die Gründe dafür sind

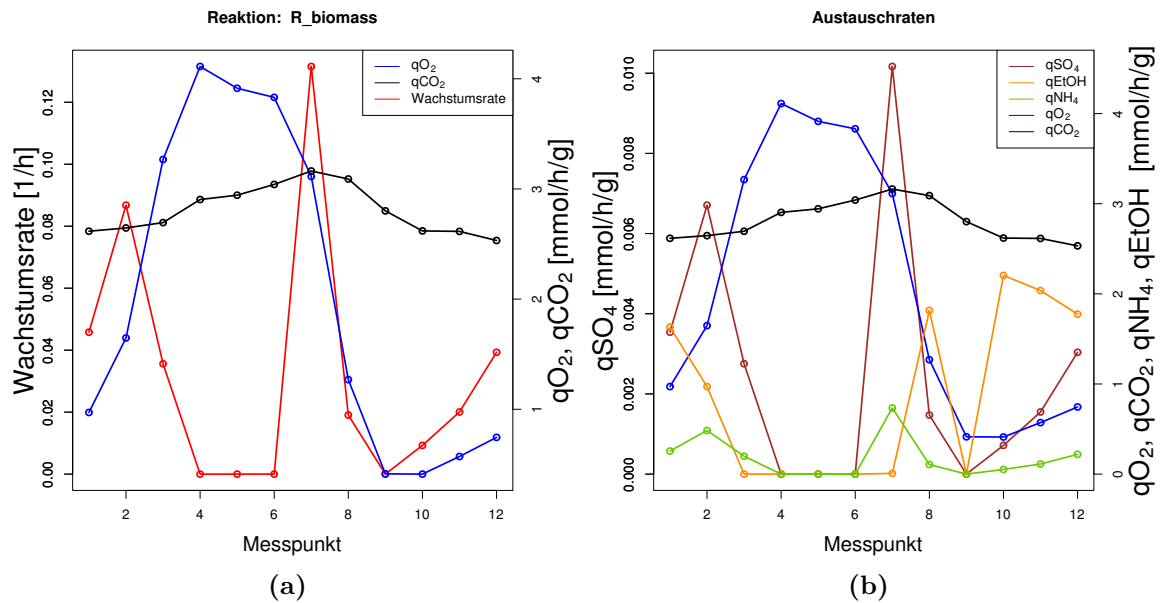


Abbildung 4.9: Maximierung der Wachstumsrate mittels FBA. Teilabbildung (a) zeigt die Abhängigkeit der maximalen Wachstumsrate von qO_2 und qCO_2 , die auf die experimentell bestimmten Werte festgesetzt sind. In jedem der zwölf Zeitpunkte wird die Wachstumsrate mittels FBA maximiert. In den Messpunkten vier, fünf und sechs sowie in dem Messpunkt neun, kann keine gültige Lösung berechnet werden. Teilabbildung (b) zeigt die damit einhergehenden Austauschraten.

Abschnitt 4.5.2 dargelegt.

Akkumulation von internen Metaboliten

Um näher zu untersuchen, worauf die Unfähigkeit des Systems beruht, in den vier genannten Zeitpunkten Biomasse zu produzieren, wird die Simulation daher dahingehend geändert, dass nun interne Metabolite überproduziert beziehungsweise akkumuliert werden können. Das bedeutet, dass die einen Metaboliten produzierenden und verbrauchenden Raten in den einzelnen Zeitpunkten nicht mehr bilanziert sein müssen. Das mag auf den ersten Blick die FBA zugrunde liegenden Prinzipien verletzen, wird jedoch technisch dadurch gelöst, dass für jeden Intermediaten eine Pseudoreaktion eingeführt wird, die diesen Metaboliten "exportiert". Wird dieser Metabolit nun innerhalb des Netzwerkes überproduziert, kann er über einen solchen "virtuellen Transporter" exportiert werden, wodurch er bilanziert ist, sich das System formal im stationären Zustand befindet und die Gleichung 4.2 nach wie vor Gültigkeit besitzt.

Dies erhöht nicht nur die Zahl der Freiheitsgrade des Systems, sondern ist auch durch die Ergebnisse in Kapitel 3.4 motiviert: Es kann von Vorteil sein, unterschiedliche Aufgaben zu unterschiedlichen Zeiten durchzuführen. Stoffe, die bei dem einen Prozess als (Neben)produkt entstehen, können von einem anderen Prozess gegebenenfalls

4 Flussbilanzanalyse zu metabolischen Zyklen in Hefe

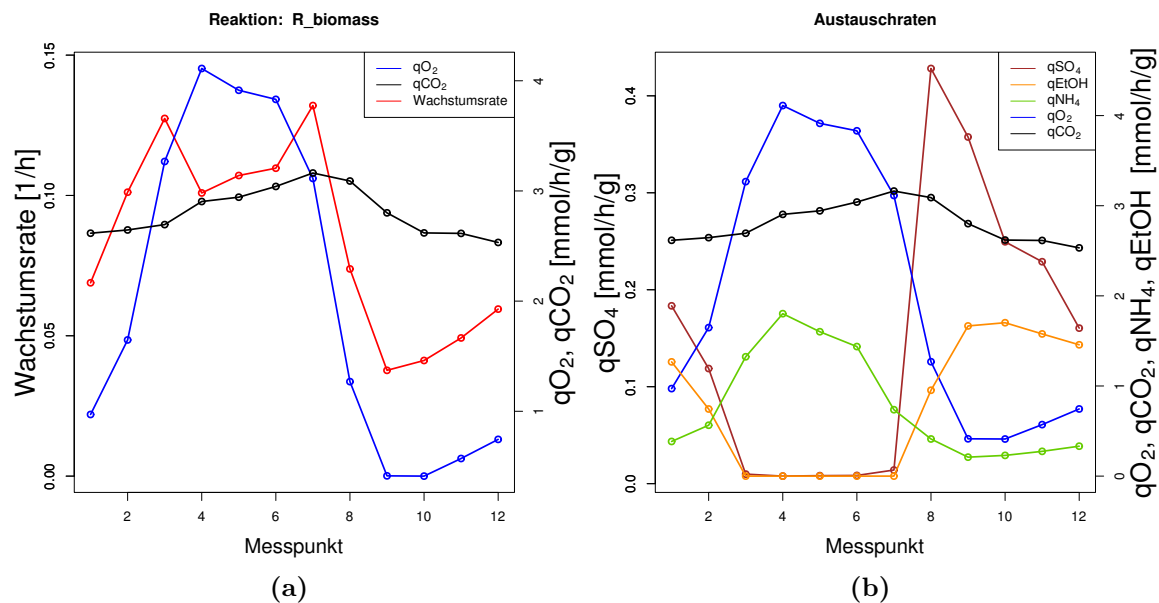


Abbildung 4.10: Teilabbildung (a) zeigt die Abhängigkeit der Austauschraten von qO_2 und qCO_2 , die auf die experimentell bestimmten Werte festgesetzt sind. In jedem der zwölf Zeitpunkte wird die Wachstumsrate mittels FBA maximiert. Die maximale Wachstumsrate ergibt sich dabei in Messpunkt acht, in dem die Sauerstoffaufnahme- und Kohlenstoffdioxidabgaberate annähernd gleiche Werte annehmen. Teilabbildung (b) zeigt die sich daraus ergebenden Austauschraten. In der reduktiven Phase - bei geringer Sauerstoffaufnahme - ist dabei ein Export von Ethanol zu beobachten.

als Substrat verwendet werden und damit den Gesamtprozess - Biomasseproduktion - optimieren.

Es wird für jedes Intermediat ein solcher virtueller Transporter zum Originalnetzwerk hinzugefügt und anschließend erneut in jedem der zwölf Zeitpunkte die Wachstumsrate optimiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.10(a) und 4.10(b) dargestellt. Man erhält nun in jedem Zeitpunkt eine Lösung, die die gegebenen Beschränkungen erfüllt. Auch hier lässt sich ein Export von Ethanol in der reduktiven Phase beobachten. Die Aufnahme- und Abgaberraten von Sulfat und Ammonium folgen nun aber nicht mehr dem Verlauf der Wachstumsrate, sondern - im Falle von Ammonium - dem von Sauerstoff; der von Sulfat lässt sich hingegen nicht unmittelbar mit den Austauschraten in Verbindung setzen (4.10(b)).

Die nicht bilanzierten Metabolite sind in Abbildung 4.11(a) dargestellt. Während in der oxidativen Phase ein Akkumulieren von Carbamoylphosphat ("Cbp") und Protonen der Atmungskette ("Hcyt") zu verzeichnen ist, wird in der reduktiven Phase Schwefelwasserstoff, H_2S , angehäuft; Diphosphat wird in beiden Phasen akkumuliert. Um zu untersuchen, ob es Alternativen zu diesen Lösungen gibt, wird eine Flussvariabilitätsanalyse [62, 90] durchgeführt. Dabei wird der jeweilige erhaltene maximale

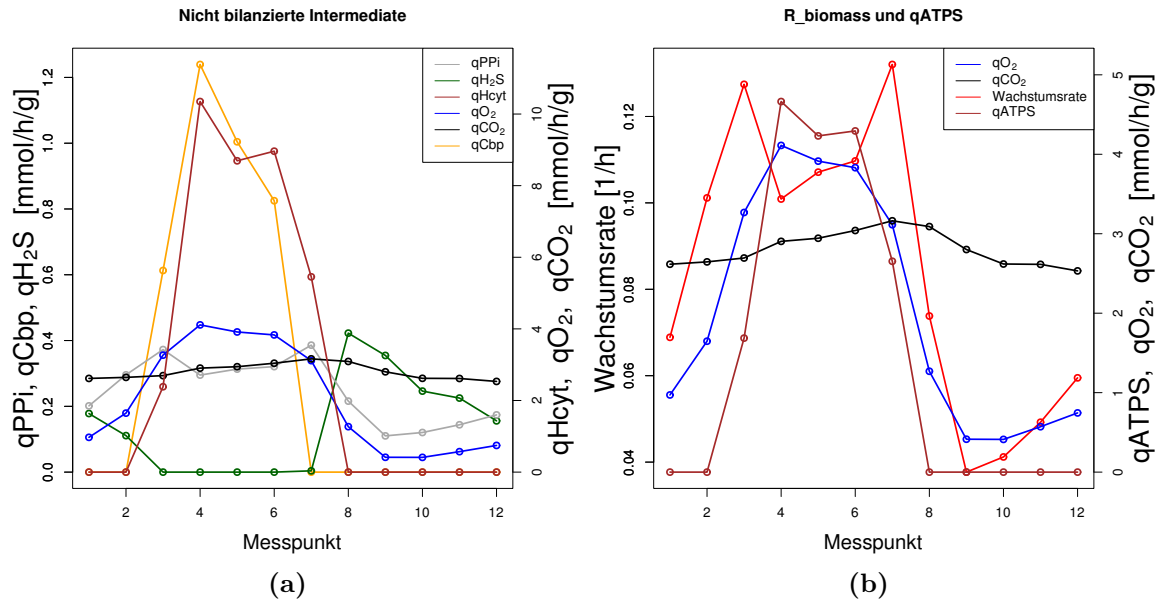


Abbildung 4.11: Teilabbildung (a) zeigt die Akkumulationsraten der nicht balanzierten Intermediate, wenn die Wachstumsrate maximiert und das Akkumulieren sämtlicher Intermediate erlaubt ist. Während es in der oxidativen Phase zur Akkumulation von Carbamoylphosphat ("Cbp") und Protonen der Atmungskette ("Hcyt") kommt, ist es in der reduktiven Phase Schwefelwasserstoff (" H_2S "). Diphosphat wird in beiden Phasen akkumuliert. Teilabbildung (b) zeigt die Wachstumsrate und die Rate des basalen *ATP*-Verbrauchs, wenn lediglich die Akkumulation von Carbamoylphosphat und Schwefelwasserstoff erlaubt ist. Die erhaltene Wachstumsraten in den einzelnen Zeitpunkten ist dabei identisch mit denen, wenn sämtliche Intermediate akkumuliert werden dürfen.

Wert für die Wachstumsrate als weitere Nebenbedingung zu den bereits existierenden Beschränkungen hinzugefügt und anschließend jede Rate des Systems minimiert und auch maximiert, worüber sich Aussagen treffen lassen, wie variabel die jeweilige Rate ist, um den Maximalwert der Wachstumsrate zu erreichen. Dabei zeigt sich, dass die Exportrate für Ethanol keinerlei Variabilität aufweist, wie auch diejenigen Reaktionen, die Carbamoylphosphat und Schwefelwasserstoff produzieren beziehungsweise verbrauchen. Der Export von Protonen der Atmungskette hingegen ist variabel.

Aufgrund der Tatsache, dass es keine Alternative zu den genannten Export- beziehungsweise Akkumulationsraten gibt, lässt sich annehmen, dass ein Ermöglichen der Akkumulation von Carbamoylphosphat und Schwefelwasserstoff hinreichend ist, um gültige Lösungen auch in den Zeitpunkten vier, fünf, sechs und neun zu erhalten, was nicht möglich ist, wenn sämtliche Intermediate balanziert zu sein haben (Abbildung 4.9(a)). Dies ist in der Tat der Fall, wie Abbildung 4.11(b) zeigt. Es kommt erneut zur Akkumulation von Carbamoylphosphat und Schwefelwasserstoff und die Wachstumsraten sind identisch mit denen, die man erhält, wenn sämtliche Intermediate akkumuliert

werden dürfen. Es lässt sich hier auch nachvollziehen, warum die Akkumulation der Protonen der Atmungskette nicht essentiell ist: Sie werden zur Produktion von *ATP* genutzt, das anschließend über die Reaktion, die den basalen Verbrauch von *ATP* repräsentiert, abgebaut wird (Abbildung 4.11(b)).

Interessanterweise liegt die Wachstumsrate in jedem Punkt höher als im zuvor betrachteten Fall, bei dem Metabolite nicht akkumuliert werden können, sondern alle Metabolite zu jedem Zeitpunkt bilanziert sein müssen. Dies erscheint kontraintuitiv, da die Stoffe, die akkumuliert werden, zunächst produziert werden müssen und die dafür verwendeten Ressourcen nicht in Wachstum investiert werden können. Dem wird im nachfolgenden Abschnitt nachgegangen.

Versuch einer (biologischen) Interpretation der exportierten/akkumulierten Metabolite

Wie im letzten Abschnitt erwähnt, gibt es für den Export beziehungsweise die Akkumulation von Ethanol, Carbamoylphosphat und Schwefelwasserstoff zu keinem Zeitpunkt über diesen Zyklus eine Variabilität innerhalb der entsprechenden Raten. Wenn diese Raten nun derart fixiert sind, obgleich lediglich die drei Austauschraten für Glucose, Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid festgelegt sind, liegt die Frage nahe, wie die Akkumulation der entsprechenden Metaboliten zu interpretieren ist und ob sich diese auch biologisch deuten lässt.

- **Ethanol**

Wie bereits in Kapitel 4.5 ausgeführt, handelt es sich bei der Produktion von Ethanol um einen Prozess der NAD^+ -Regeneration. Das in der Glykolyse und dem Citratzyklus produzierte *NADH* kann aufgrund von Sauerstofflimitierung - Ethanolexport ist ausschließlich in der reduktiven Phase zu beobachten (Abbildung 4.10(b)) - nicht mehr vollständig für die Atmung verwendet werden, weswegen NAD^+ mittels Ethanolproduktion regeneriert werden muss, um selbiges für die Glykolyse wiederzugewinnen. Das entstehende Ethanol wird exportiert. Da es sich bei der Produktion von Ethanol um die ineffizientere Variante der *ATP*-Produktion handelt, ist die Wachstumsrate in der reduktiven Phase deutlich geringer als in der oxidativen.

- **Carbamoylphosphat**

Die Akkumulation von Carbamoylphosphat ist immer dann zu beobachten, wenn die Sauerstoffaufnahme die Kohlenstoffdioxidproduktionsrate übersteigt. Sauerstoff kann fast ausschließlich in der Atmungskette verarbeitet werden, was mit einer Produktion von Kohlenstoffdioxid im Citratzyklus einhergeht. Bei Aufnahme von Sauerstoff, die oberhalb der festgesetzten Abgaberate für Kohlenstoffdioxid liegen, ist das System nun mit dem Problem konfrontiert, dieses überschüssige Kohlenstoffdioxid zu verarbeiten, was nicht möglich scheint, wenn alle Metabolite bilanziert werden müssen. Daher können in drei Zeitpunkten der oxidativen Phase keine gültigen Lösungen für die Wachstumsrate berechnet werden (Abbildung 4.9(a)).

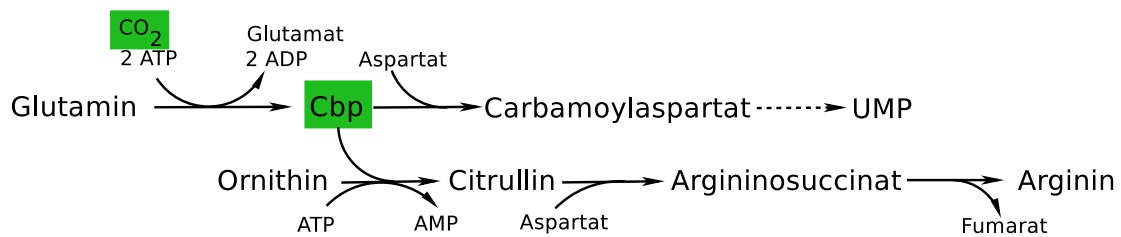


Abbildung 4.12: Zwei Stoffwechselwege, in die Carbamoylphosphat (“Cbp”) involviert ist. Wasser und Phosphate sind in der Darstellung nicht berücksichtigt. Für die Bildung von Carbamoylphosphat aus Glutamin wird Kohlenstoffdioxid benötigt. Cbp ist ein Vorläufer der Argininsynthese und ist zudem in den Pyrimidinstoffwechsel involviert.

Dieses Problem wird durch die Akkumulation von Carbamoylphosphat gelöst, da für dessen Synthese Kohlenstoffdioxid (beziehungsweise Hydrogencarbonat) vonnöten ist (Abbildung 4.12). Das durch die Verarbeitung von Sauerstoff produzierte Kohlenstoffdioxid wird also für die Produktion von Carbamoylphosphat verwendet, das akkumuliert wird, weswegen sich eine gültige Lösung für die Produktion von Biomasse finden lässt. Aus “technischer” Sicht ist die Möglichkeit zur Akkumulation von Intermediaten lediglich ein weiterer Freiheitsgrad für das System, der in diesem Falle hilft, die Beschränkung für die Kohlenstoffdioxidabgaberate zu “umgehen”.

In dem eigentlichen System, dem Chemostat, werden die Austauschraten jedoch nicht von außen festgelegt, sondern durch das Verhalten der Hefekultur bestimmt. Könnte es also neben der rein technischen Erklärung auch einen biologischen Hintergrund geben, über den sich eine hohe Bildungsrate für Carbamoylphosphat in der oxidativen Phase erklären ließe?

Carbamoylphosphat wird im Wesentlichen in zwei Biosynthesewege benötigt: zum einen um Arginin aus Ornithin zu bilden und zum anderen für die Produktion von Pyrimidinen, die für DNA-Synthese benötigt werden (Abbildung 4.12). Die Replikation von DNA startet in der Regel, nachdem die Sauerstoffaufnahme ihre Rate erreicht hat [54], was mit dem Zeitpunkt zusammenfällt, an dem keine Akkumulation von Carbamoylphosphat mehr zu verzeichnen ist (Abbildung 4.11(a)). Es lässt sich nun also spekulieren, dass während der oxidativen Phase Nukleotide synthetisiert werden, damit sie anschließend für die Replikation für DNA zur Verfügung stehen.

• Schwefelwasserstoff

Die Akkumulation von Schwefelwasserstoff erfolgt immer dann, wenn die Sauerstoffaufnahme unterhalb der Kohlenstoffdioxidproduktionsrate liegt.

Er wird unter Aufnahme von Sulfat über einen linearen Syntheseweg gebildet und unter anderem für die Synthese von sulfathaltigen Aminosäuren, wie Cystein und Methionin verwendet. Wie lässt sich aber erklären, dass dessen Akkumulation

dazu führt, dass nun eine gültige Lösung für die Produktion von Biomasse berechnet werden kann?

Dies lässt sich nur verstehen, indem man die für die Bildung von Schwefelwasserstoff notwendigen Co-Faktoren in die Überlegungen mit einbezieht. Um aus einem Mol Sulfat ein Mol an Schwefelwasserstoff zu generieren, werden in dem verwendeten Modell ein Mol *ATP* und vier Mol *NADPH* benötigt, so dass der Schluss naheliegt, dass letzteres unter den gegebenen Austauschraten in höherem Maße produziert wird, als es für Biosynthese benötigt wird. Die Bildung von Schwefelwasserstoff beruht dann darauf, dass dieses überschüssige *NADPH* abgebaut werden muss.

Um dieser Idee nachzugehen, wird dem Netzwerk eine weitere Reaktion hinzugefügt, bei der *NADPH* zu *NADP⁺* umgewandelt wird; sie wird im Folgenden als *qNADPHS* bezeichnet. Sollte der geäußerte Gedanke richtig sein, würde man erwarten, dass die Akkumulation von Schwefelwasserstoff durch diese Reaktion ersetzt wird, wenn die Simulationen analog zu den obigen durchgeführt werden, da so ein Mol an *ATP* zusätzlich für Biosynthese verwendet werden könnte. Dies ist in der Tat der Fall, wie man in Abbildung 4.13(a) erkennen kann.

Wie schon für Carbamoylphosphat lässt sich dies aus technischer Sicht erklären und über einen biologischen Hintergrund zumindest spekulieren. Gegeben die geringe Sauerstoffaufnahme in der reduktiven Phase, die unterhalb der Kohlenstoffdioxidabgaberate liegt, kann das Kohlenstoffdioxid, das gemäß der Beschränkungen produziert werden muss, nicht ausschließlich aus Respirationsprozessen heraus gewonnen werden. Stoffwechselwege, die Kohlenstoffdioxid produzieren und nicht an Sauerstoff gekoppelt sind, findet man beispielsweise im Pentose-Phosphat-Weg, der wiederum die Hauptquelle für *NADPH* ist. Dieses entsteht dann also als "Nebenprodukt", wenn Kohlenstoffdioxid produziert wird, um die Beschränkung für die Kohlenstoffdioxidabgaberate einzuhalten.

In der tatsächlichen Zelle, in der die Austauschraten für Glucose, Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid nicht vorgegeben sind, sondern auf dem Verhalten der Kultur beruhen, mag es sich genau umgekehrt verhalten: Kohlenstoffdioxid ist das Nebenprodukt der *NADPH*-Produktion. Der hohe Bedarf an *NADPH* in dieser Phase könnte, so lässt sich spekulieren, mit der DNA-Replikation, die in dieser Phase des Zyklus stattfindet, und dem Abbau von ROS zusammenhängen. Stoffwechselwege, die in den Abbau von ROS - die DNA schädigen können - involviert sind, sind abhängig von *NADPH* [6, 78]; hohe Produktionsraten des selbigen nach der Phase höchster Sauerstoffaufnahme und Produktion von ROS könnten also eine effiziente Detoxifizierung der Zelle gewährleisten, um die Unversehrtheit des Genoms zu gewährleisten [9, 54, 117]. Der Überschuss an *NADPH*, der hier im Modell zu beobachten ist, tritt interessanterweise direkt in der Phase auf, in der *NADPH* im Experiment die maximale Konzentration aufweist [77], wo sie mit Initialisierung der Zellteilung zusammenfällt.

4.5 Wachstumsrate im Chemostat - Modell und Experiment

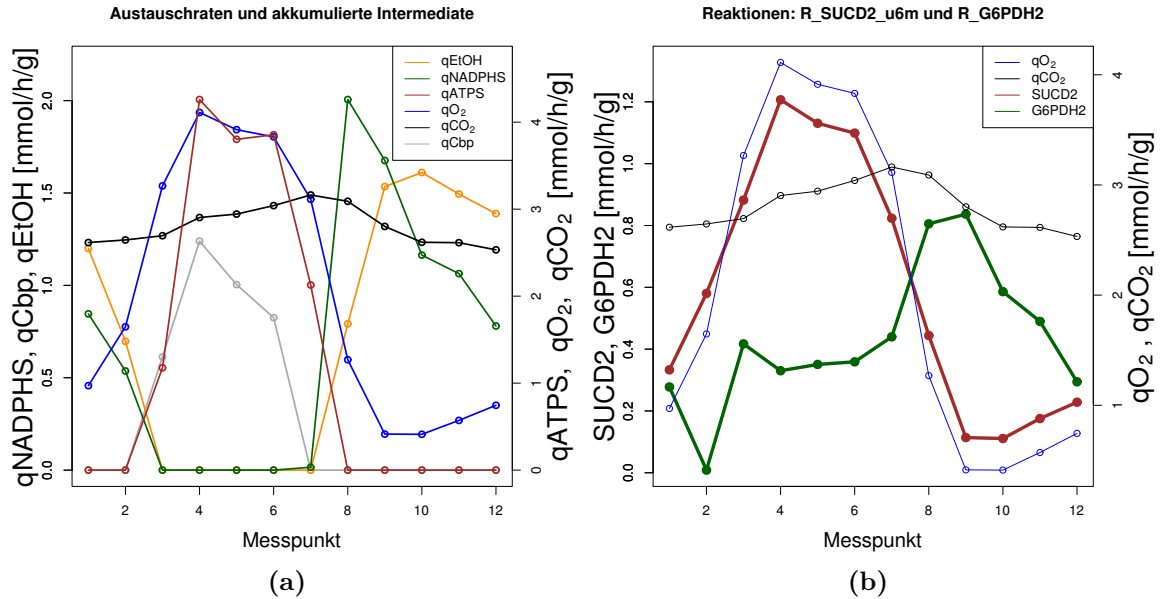


Abbildung 4.13: Austausch- und interne Raten in Abhängigkeit der Glucoseaufnahmerate, Sauerstoffaufnahme sowie der Kohlenstoffdioxidabgaberate, wenn die Wachstumsrate mittels FBA maximiert wird. Teilabbildung (a) zeigt die Austausch- und Akkumulationsraten sowie die Raten des basalen Verbrauchs an *ATP* und *NADPH*. Während in der oxidativen Phase Carbamoylphosphat ("Cbp") akkumuliert wird und ein basaler Verbrauch von *ATP* zu verzeichnen ist, sieht man in der reduktiven Phase einen basalen Verbrauch von *NADPH* und es wird Ethanol ausgeschieden. Teilabbildung (b) zeigt die damit einhergehenden Raten der ersten Reaktion des Pentose-Phosphat-Weges ("R_G6PDH2") und einer Reaktion des Citratzyklus ("R_SUCD2_u6m"). Erstere verzeichnet während der oxidativen Phase ihr Maximum, zweitere in der reduktiven.

In Abbildung 4.13(a) sind die drei Metabolite, die akkumuliert beziehungsweise exportiert werden, die basalen Verbrauchsrate an *ATP* und *NADPH* zusammenfassend dargestellt. Es lässt sich erkennen, dass in der oxidativen Phase eine Überproduktion an *ATP* und in der reduktiven Phase eine Überproduktion von *NADPH* erfolgt. Dies legt den Schluss nahe, dass bei hoher Sauerstoffaufnahme der Citratzyklus aktiv ist, der für auf Respiration beruhende *ATP*-Produktion vonnöten ist, während bei niedriger Sauerstoffaufnahme der Pentose-Phosphat-Weg eine hohe Aktivität verzeichnet, worüber *NADPH* generiert wird.

Um dies zu untersuchen, wird ein Aktivitätsprofil der erhaltenen Flusslösungen betrachtet, das in Abbildung 4.14 dargestellt ist. Diese Flussverteilungen sind das Resultat der in diesem Abschnitt durchgeführten Maximierung der Wachstumsrate, wenn die Akkumulation von Intermediaten erlaubt ist.

Es zeigt sich deutlich, dass es Reaktionen gibt, die mit der oxidativen Phase assoziiert sind, während andere in der reduktiven Phase aktiv sind. Herausgegriffen aus dieser

globalen Lösung werden dabei zwei zentrale Reaktionen des Stoffwechsels, die mit der Produktion von *ATP* und *NADPH* verbunden sind:

- **R_SUCD2_u6m**

Dabei handelt es sich um eine Reaktion, die sowohl Teil des Citratzyklus als auch der Atmungskette ist, wobei Succinat zu Fumarat umgewandelt wird unter Verwendung von Ubiquinone-6, was zur Bildung von Ubiquinol-6 führt, das dann in der Elektronentransportkette Verwendung findet. Die Reaktion kann demnach als Maß für die Aktivität des Citratzyklus als auch der Atmungskette gesehen werden, über welche unter aeroben Bedingungen *ATP* produziert wird.

- **R_G6PDH2**

Dies ist die erste Reaktion des Pentose-Phosphat-Weges, bei der aus Glucose-6-Phosphat 6-Phosphogluconolacton entsteht unter Bildung von *NADPH*. Der Pentose-Phosphat-Weg stellt die Hauptquelle für *NADPH* dar.

Abbildung 4.13(b) zeigt die beiden entsprechenden Raten. Es lässt sich erkennen, dass der Pentose-Phosphat-Weg seine höchste Aktivität während der reduktiven Phase verzeichnet, während die Reaktion des Citratzyklus ihre höchste Rate während der oxidativen Phase zeigt. Es findet also zumindest im Modell in der Tat ein Umschalten zwischen diesen wichtigen Stoffwechselwegen des Zentralstoffwechsels statt. Dem wird im nachfolgenden Abschnitt näher nachgegangen.

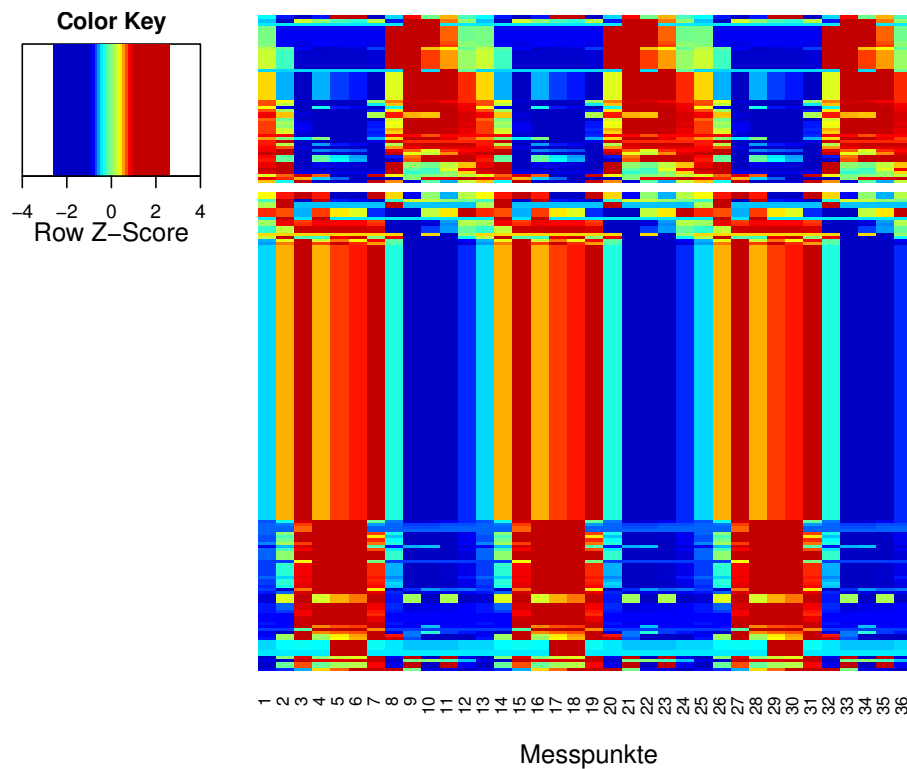


Abbildung 4.14: Die Flusslösungen, die sich bei der Maximierung der Wachstumsrate ergeben. Zu Zwecken einer Fourieranalyse sind zwei weitere identische Zyklen hinzugefügt. Während bestimmte Reaktionen bei hoher Sauerstoffaufnahme aktiv sind (Zeitpunkte 3-7, 15-19, 27-31), verzeichnen andere ihre maximalen Raten bei geringer Sauerstoffaufnahme (Zeitpunkte 9-11, 21-23, 33-35).

4.5.4 Maximierung der ATP- und NADPH-Produktion in Abhängigkeit der Austauschraten

Sowohl *ATP* als auch *NADPH* sind wichtige Co-Faktoren für biosynthetische Prozesse. Wie im letzten Abschnitt gezeigt, werden sie - wenn die Wachstumsrate optimiert wird - in unterschiedlichen Phasen überproduziert, was mit einem Umschalten zwischen den Stoffwechselwegen, über die sie hauptsächlich produziert werden, einhergeht. Könnten die gemessenen Austauschraten beziehungsweise die metabolischen Zyklen in Hefe also ein Umschalten zwischen Produktion von *ATP* und *NADPH* repräsentieren? Und falls ja, warum könnte dies von Vorteil oder gar notwendig sein? Diese Fragen werden in diesem Abschnitt untersucht.

Dazu wird zunächst getestet, inwieweit die jeweiligen Produktionsraten beider Metabolite von den gemessenen Austauschraten beeinflusst wird. Dazu werden die analogen Simulationen wie im vorangegangenen Abschnitt durchgeführt, nur dass diesmal nicht die Wachstumsrate, sondern die basalen Verbrauchsdaten von *ATP* und *NADPH* maximiert werden. Die Austauschraten für Glucose, Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid sind festgesetzt.

Abbildung 4.15 zeigt die jeweils maximal möglichen Produktionsraten für *ATP* und auch *NADPH* über den Zyklus und es ergibt sich ein ähnliches Bild wie im vorangegangenen Abschnitt. Während *ATP* seine maximale Produktionsrate während der oxidativen Phase erreicht, liegt sie für *NADPH* zwischen beiden Phasen und verzeichnet ihr Minimum in der oxidativen Phase.

Der Kurvenverlauf für *ATP* ist dabei unmittelbar einsichtig, da die Produktion von *ATP* umso effizienter ablaufen kann, je mehr Sauerstoff zur Verfügung steht und der effizienteste Weg des Glucoseabbaus für die *ATP*-Erzeugung - Respiration - gewählt werden kann. Der Einfluss der Austauschraten auf die *NADPH*-Produktion ist hingegen schwieriger zu verstehen. Daher wird die Wirkung der jeweiligen Austauschraten auf die Produktionsraten näher untersucht, auch um zu verstehen, welche der Beschränkungen den stärksten Einfluss auf die jeweilige Bildungsrate ausübt.

Unbeschränkte Kohlenstoffdioxidproduktionsrate

Zunächst werden dabei lediglich die Glucoseaufnahmerate und die Sauerstoffaufnahmerate festgelegt - die Kohlenstoffdioxidabgaberate hingegen ist unbeschränkt - und getestet, inwieweit die Systeme hinsichtlich des Kohlenstoffdioxidexports limitiert sind.

Abbildung 4.16 zeigt die sich daraus ergebenden Ergebnisse für die optimalen Produktionsraten für *ATP* und *NADPH*. In beiden Fällen wird deutlich mehr Kohlenstoffdioxid exportiert als zuvor. Während sich die Form der Kohlenstoffdioxidabgaberate bei der Optimierung auf *ATP* der der Sauerstoffaufnahmerate anpasst (Abbildung 4.16(a)), ist sie im Falle der Optimierung auf *NADPH* konstant (Abbildung 4.16(b)) und anscheinend unabhängig von der Sauerstoffaufnahmerate.

Dass für *ATP* in der oxidativen Phase nun eine höhere Produktionsrate zu beobachten ist, ist darauf zurückzuführen, dass Glucose im Falle von unbeschränkter Kohlenstoffdi-

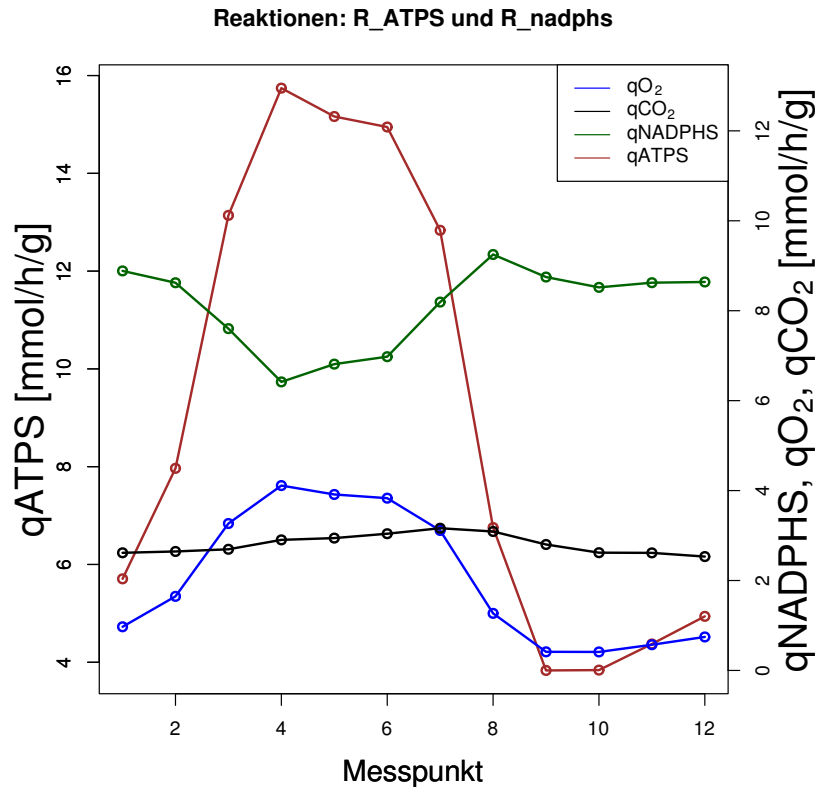


Abbildung 4.15: Optimierung der Produktionsraten für *ATP* und *NADPH* bei festgesetzten Raten für die Glucoseaufnahme, Sauerstoffaufnahme und Kohlenstoffdioxidabgaberate. Während die höchste Produktionsrate für *ATP* in der oxidativen Phase möglich ist und die geringste Rate in der reduktiven erreicht wird, kann die höchste Syntheserate für *NADPH* im Übergang zwischen der oxidativen und der reduktiven Phase erzielt werden, während sie in der oxidativen Phase ihren Minimalwert annimmt.

oxidproduktion vollständig über der Citratzyklus, in dem Kohlenstoffdioxid produziert wird, verarbeitet werden kann. Das führt zu einem zu der erhöhten Produktionsrate von *ATP*, da die Reaktion von Succinyl-CoA zu Succinat - bei der im verwendeten Modell *ATP* freigesetzt wird - mit einer höheren Rate ablaufen kann und auch zu der höheren Abgabe von Kohlenstoffdioxid, da auch die Reaktionen von Isocitrat zu α -Ketoglutarat und von α -Ketoglutarat zu Succinyl-CoA - bei denen jeweils Kohlenstoffdioxid frei wird - mit einer höheren Rate ablaufen.

Die höheren Raten im Citratzyklus steigern ebenfalls den Bedarf an Acetyl-CoA, das in selbigen eingespeist wird, bei dessen Produktion aus Pyruvat ebenfalls Kohlenstoffdioxid frei wird. Diese Effekte lassen den Kohlenstoffdioxidexport stark ansteigen und es kann eine leicht erhöhte Produktionsrate für *ATP* erzielt werden.

In der reduktiven Phase hingegen ist weder für die *ATP*-Produktionsrate noch für die Kohlenstoffdioxidabgaberate ein nennenswerter Unterschied zu den vorangegangenen

4 Flussbilanzanalyse zu metabolischen Zyklen in Hefe

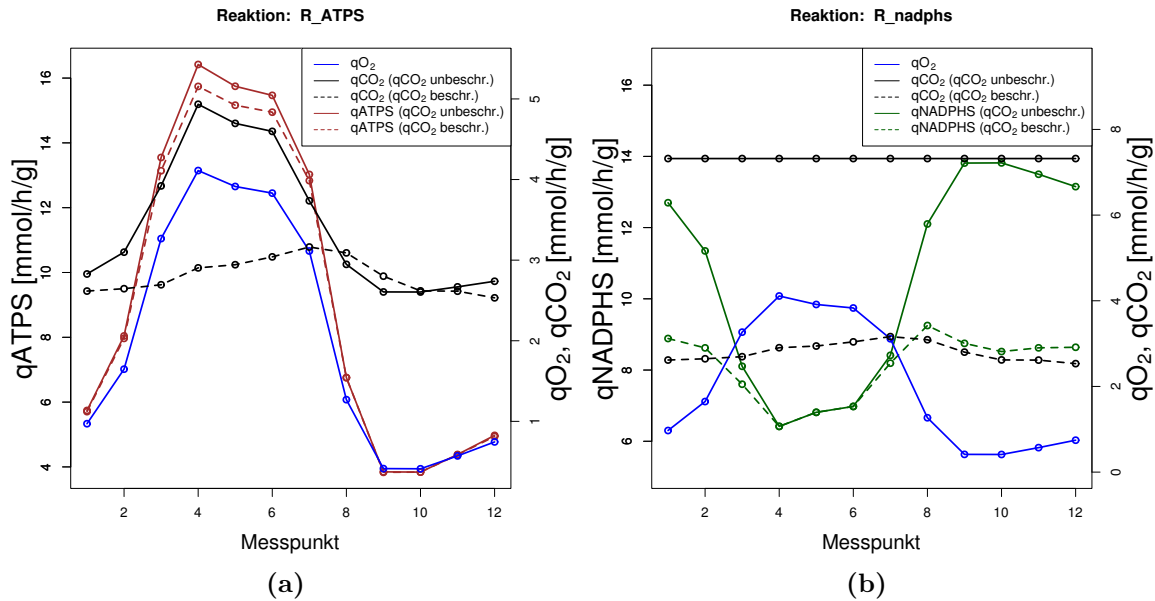


Abbildung 4.16: Optimierung der Produktionsraten für *ATP* (Teilabbildung (a)) und *NADPH* (Teilabbildung (b)). Die Sauerstoffaufnahme ist jeweils beschränkt, während die Kohlenstoffdioxidproduktionsrate unbeschränkt ist. Die Lösungen werden mit denjenigen verglichen, die man erhält, wenn alle drei Austauschraten für Glucose, Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid festgesetzt sind.

nen Simulationen festzustellen. Dies beruht auf der Sauerstofflimitierung, da das in der Glykolyse entstehende *NADH* nicht über Respiration zu *NAD*⁺ abgebaut werden kann, sondern dies über Ethanolproduktion geschehen muss. Glucose kann also in dieser Phase nicht wesentlich effizienter umgebaut werden, sondern es muss der ineffiziente Weg der *ATP*-Produktion über Fermentierung erfolgen.

Für die Produktionsrate von *NADPH* sind wesentlich größere Effekte zu beobachten (Abbildung 4.16(b)). Die Kohlenstoffdioxidabgaberate scheint dabei von der Sauerstoffaufnahme unbeeinflusst und nimmt stets den maximal möglichen Wert an: sämtliche aufgenommene Glucose wird in Kohlenstoffdioxid überführt. Dies führt in der oxidativen Phase dennoch nicht zu einer Steigerung der *NADPH*-Produktionsrate, die dort ihr Minimum erreicht, wo die Sauerstoffaufnahme ihr Maximum besitzt. Dies liegt daran, dass das System den Sauerstoff nur über die Atmungskette verarbeiten kann, wobei *ATP* produziert wird. Die dafür notwendige Glucose steht somit nicht für die Produktion für *NADPH* zur Verfügung, da Glucose-6-Phosphat nicht in den Pentose-Phosphat-Weg eingespeist werden kann, sondern über die Glykolyse verarbeitet wird, um Citratzyklusintermediate zu generieren.

Je weniger Sauerstoff das System zu verarbeiten hat, desto mehr kann der Glucoseumbau über den Pentose-Phosphat-Weg stattfinden, was erklärt, warum die maximale Rate für *NADPH*-Produktion bei minimaler Sauerstoffaufnahme zu verzeichnen

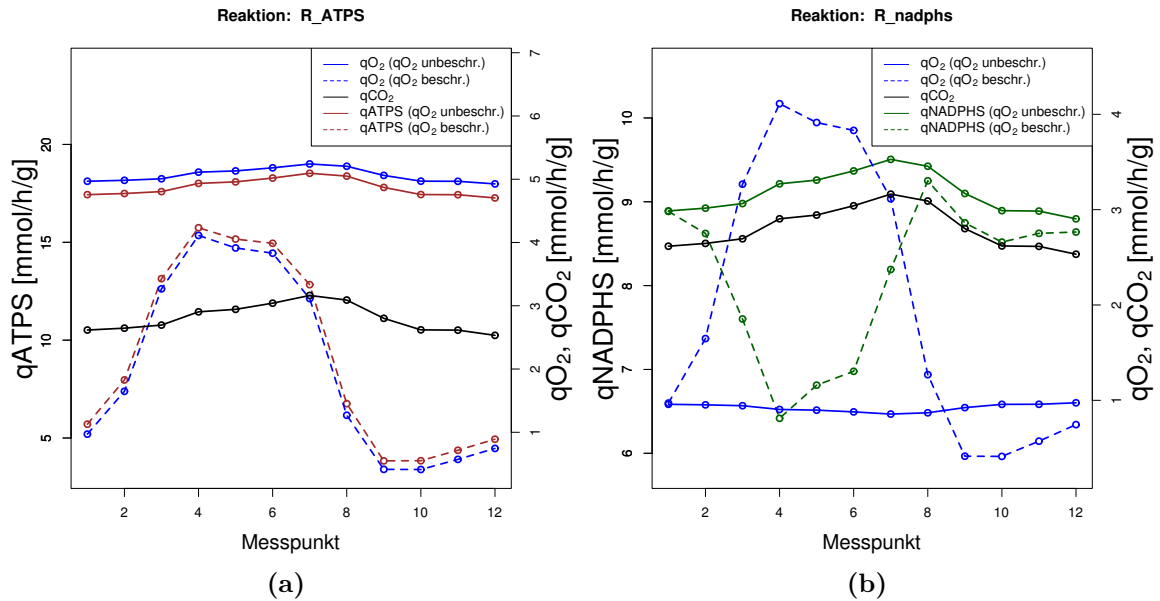


Abbildung 4.17: Optimierung der Produktionsraten für *ATP* (Teilabbildung (a)) und *NADPH* (Teilabbildungen (b)). Die Sauerstoffaufnahme ist jeweils unbeschränkt, während die Kohlenstoffdioxidproduktionsrate einer Einschränkung unterliegt. Die Lösungen werden mit denjenigen verglichen, die man erhält, wenn alle drei Austauschraten für Glucose, Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid festgesetzt sind.

ist. Die Produktion von *NADPH* im Pentose-Phosphat-Weg ist ebenfalls an Kohlenstoffdioxidproduktion gekoppelt, was die erhöhte Kohlenstoffdioxidabgaberate erklärt.

Unbeschränkte Sauerstoffaufnahme

Als nächstes wird getestet, wie sich eine unbeschränkte Sauerstoffaufnahme auf die Produktionsraten für *ATP* und *NADPH* auswirkt - die Kohlenstoffdioxidabgaberate und Glucoseaufnahme sind festgesetzt. Die Resultate sind in Abbildung 4.17 dargestellt.

Wie bereits aus den vorangegangenen Simulationen ableitbar, erhöht sich die *ATP*-Produktionsrate in erheblichem Maße, wenn die Sauerstoffaufnahme nicht beschränkt ist. Die Form des Kurvenverlaufs der Sauerstoffaufnahme passt sich dabei dem der Kohlenstoffdioxidabgaberate an. Je mehr Sauerstoff als Elektronenakzeptor zur Verfügung steht, desto höher können die Raten der Atmungskette - andere Limitierungen außer acht lassend - sein, über die *ATP* produziert wird. Kohlenstoffdioxid wird dabei ausschließlich im Citratzyklus und bei der Produktion von Acetyl-CoA, das ebenfalls für den Citratzyklus vonnöten ist, produziert.

Die Produktionsrate für *NADPH* kann bei unbegrenzter Sauerstoffaufnahme ins-

besondere in der oxidativen Phase stark gesteigert werden. Das Aufheben der Beschränkung der Sauerstoffaufnahme führt zur einer starken Verringerung selbiger, da dadurch Glucose nun überwiegend über den Pentose-Phosphat-Weg abgebaut werden kann und nicht mehr für den Ablauf der Atmungskette investiert werden muss.

Dass überhaupt Sauerstoff aufgenommen wird, liegt daran, dass im Pentose-Phosphat-Weg mehr Kohlenstoffdioxid produziert wird, als das System durch die Beschränkung der Kohlenstoffdioxidabgaberate abzugeben erlaubt ist. Daher wird Sauerstoff aufgenommen, der zur Erzeugung von *ATP* genutzt wird, das wiederum zur Produktion von Carbamoylphosphat - die *ATP* erfordert - genutzt wird, welches dann akkumuliert wird, was bereits in Abschnitt 4.5.3 diskutiert ist.

Somit lässt sich erklären, warum die Kurve für die Sauerstoffaufnahme ihre Minimum dort aufweist, wo die der Kohlenstoffdioxidabgaberate ihr Maximum besitzt: Je mehr Kohlenstoffdioxid abgegeben werden darf, desto weniger *ATP* wird benötigt, um dieses abzubauen, weswegen weniger Sauerstoff für die Erzeugung von *ATP* benötigt wird. Damit ist auch unmittelbar einsichtig, warum in der reduktiven Phase sogar mehr Sauerstoff aufgenommen wird als im Falle einer unbeschränkten Aufnahme; auch hier liegt die Ursache in der Produktion von *ATP* begründet, das zum Abbau von Kohlenstoffdioxid genutzt wird.

Kompromiss zwischen *ATP*- und *NADPH*-Produktion

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Produktionsraten von *NADPH* und *ATP*, die für die Synthese von Biomasse von zentraler Bedeutung sind, stark von der Sauerstoffaufnahme und der Kohlenstoffdioxidabgaberate abhängen. Während die Produktion von *ATP* mit hohen Raten ablaufen kann, wenn hohe Level an Sauerstoff zur Verfügung stehen, verhält es sich für die Produktionsrate für *NADPH* genau umgekehrt. Das liegt im Falle von *ATP* daran, dass für dessen effiziente Bildung Sauerstoff als Elektronenakzeptor in der Atmungskette benötigt wird. Je weniger Sauerstoff zur Verfügung steht, desto geringer sind die Raten innerhalb der Atmungskette und die *ATP*-Produktion.

Bei *NADPH* ist es anders gelagert. Dessen Produktion wird nicht direkt vom Sauerstoff inhibiert, wie die Kurvenverläufe in den Abbildungen 4.15 und 4.16(b) gegebenenfalls suggerieren mögen, sondern es handelt sich um einen indirekten Effekt, da die Sauerstoffaufnahme, die hier erzwungen wird mittels der entsprechenden Beschränkungen, mangels Alternativen zur Verarbeitung von Sauerstoff zu einer Produktion von *ATP* führt. Die dafür benötigten Ressourcen stehen dann nicht mehr für die Produktion von *NADPH* zur Verfügung, was dessen Produktionsrate vermindert.

Dieser Kompromiss, der zwischen der Produktion von *ATP* und *NADPH* getroffen werden muss, lässt sich auch in Abbildung 4.18 gut erkennen. Optimiert wurde zum einen die *ATP*-Produktion in Abhängigkeit einer festgesetzten Rate für den Verbrauch von *NADPH* (Abbildung 4.18(a)) und zum anderen die *NADPH*-Produktion in Abhängigkeit eines basalen Verbrauchslevels von *ATP* (Abbildung 4.18(b)). Beschränkt ist lediglich die Glucoseaufnahme; die Sauerstoffaufnahme und Kohlenstoffdioxidabgaberate sind jeweils unbeschränkt.

4.5 Wachstumsrate im Chemostat - Modell und Experiment

In beiden Szenarien wird jeweils die Glucose vollständig verarbeitet, wodurch die Kohlenstoffdioxidabgaberate konstant ist. Die Sauerstoffaufnahme hingegen ist an die *ATP*-Produktion gekoppelt: je höher diese ausfällt, desto höher ist auch der Bedarf an Sauerstoff. Wenn der basale *ATP*-Verbrauch ausgeschaltet wird und Glucose vollständig in die Produktion von *NADPH* über den Pentose-Phosphat-Weg fließen könnte, ist die Sauerstoffaufnahme annähernd 0. Der wenige aufgenommene Sauerstoff wird dabei für die *ATP*-Erzeugung genutzt, das notwendig ist, um den oberen Teil der Glykolyse ablaufen zu lassen. Der Pentose-Phosphat-Weg startet am Glucose-6-Phosphat, das nur unter Verbrauch von *ATP* gebildet werden kann, so dass ein gewisser Bedarf an *ATP* auch für die Erzeugung von *NADPH* besteht. Dieser könnte auch aus dem unteren Teil der Glykolyse heraus gedeckt werden, was allerdings den Fluss in den Pentose-Phosphat-Weg und damit die *NADPH*-Produktionsrate vermindern würde. Daher wird der weitere glykolytische Fluss derart gewählt, dass gerade so viel Acetyl-CoA und Citratzyklusintermediate - die für die aerobe Erzeugung von *ATP* vonnöten sind - gebildet werden können, dass die Aktivierung der Glucose im ersten Schritt der Glykolyse gewährleistet ist.

4 Flussbilanzanalyse zu metabolischen Zyklen in Hefe

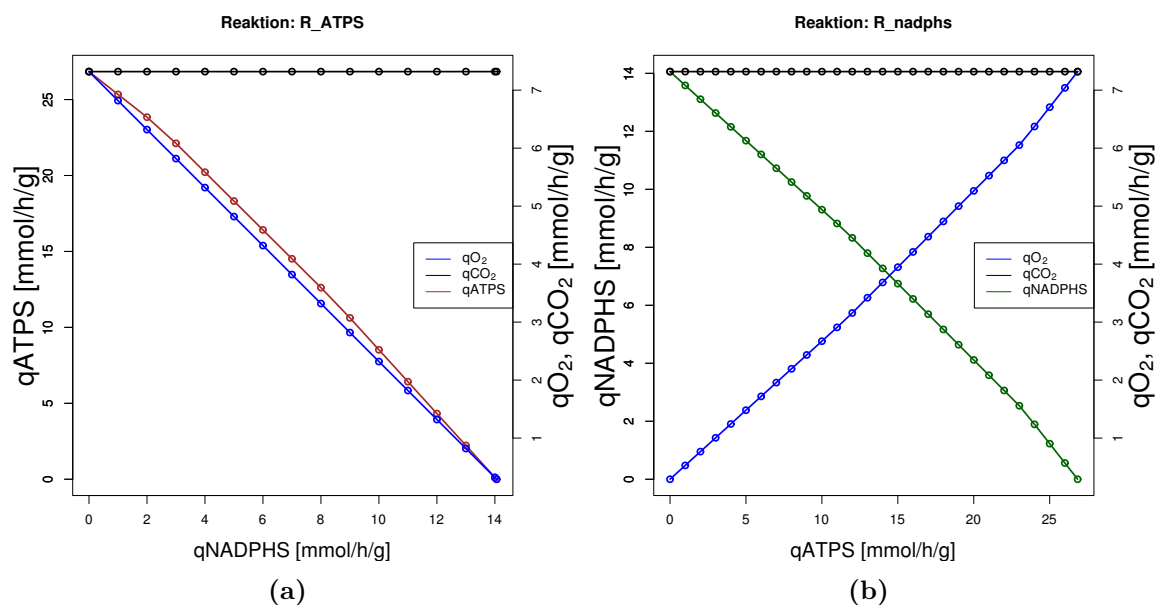


Abbildung 4.18: Optimierung der Produktionsraten von *ATP* in Abhängigkeit des basalen Verbrauchs von *NADPH* (Teilabbildung (a)) und der *NADPH*-Produktionsrate in Abhängigkeit des basalen Verbrauchs von *ATP* (Teilabbildung (b)). Beschränkt ist lediglich die Glucoseaufnahmerate; für Sauerstoffaufnahme und Kohlenstoffdioxidabgaberate gibt es hingegen keine Beschränkungen. Der aufgenommene Kohlenstoff wird jeweils vollständig in Kohlenstoffdioxid überführt. Die Sauerstoffaufnahme ist an die Produktion von *ATP* gekoppelt, die umso höher ausfällt, desto mehr Sauerstoff aufgenommen wird. Die maximale Produktionsrate von *NADPH* wird hingegen für eine Sauerstoffaufnahme erreicht, die annähernd 0 beträgt.

4.6 Maximierung von Produktionsraten einzelner Biomassekomponenten

Im letzten Abschnitt ist gezeigt, dass die optimalen Bildungsraten für *ATP* und *NADPH* über den Zyklus hinweg stark unterschiedlich ausfallen. Sowohl *ATP* als auch *NADPH* werden für die Synthese von Biomasse benötigt, wobei der Bedarf zwischen den einzelnen Biomassekomponenten variiert. Während es sich beispielsweise bei der Lipidsynthese um einen stark *NADPH*-verbrauchenden Prozess handelt, ist selbiges für bestimmte Zucker, wie zum Beispiel $\beta(1,3)$ -D-Glucan und Mannan nicht vonnöten, da diese aus Intermediaten der Glykolyse entstehen, aus Glucose-6-Phosphat beziehungsweise Fructose-6-Phosphat. Diese Unterschiede werden in diesem Abschnitt genauer quantifiziert und mit den optimalen Bildungsraten der Biomassekomponenten über den Zyklus hinweg in Verbindung gesetzt.

Der Bedarf an *ATP* beziehungsweise *NADPH* - den beiden wohl wichtigsten Co-Faktoren für die Biosynthese jeder einzelnen Biomassekomponenten - wird mittels FBA bestimmt. Die Glucoseaufnahmerate wird dabei auf $1 \frac{\text{mmol}}{\text{h}\cdot\text{g}}$ festgesetzt und ist zugleich die einzige Kohlenstoffquelle. Sauerstoffaufnahmerate und Kohlenstoffdioxidabgaberate sind hingegen unbeschränkt. Des Weiteren ist es dem System gestattet, unbegrenzt *ATP* und *NADPH* über die so genannten "virtuellen Transport" (Kapitel 4.1) aufzunehmen; sie brauchen also nicht innerhalb des System produziert werden. Auch die Akkumulation aller Intermediate ist erlaubt, womit der tatsächliche Nettoverbrauch von *ATP* und *NADPH* ermittelt werden soll. Anschließend wird die Produktionsrate jeder einzelnen Biomassekomponenten maximiert.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.2 festgehalten, darunter auch das Verhältnis von *NADPH*- zu *ATP*-Bedarf. Obwohl *ATP* unbegrenzt zur Verfügung steht und dessen Produktion daher nicht erforderlich ist, wird für die Synthese der meisten Biomassekomponenten dennoch Sauerstoff aufgenommen, der zur Generierung von *ATP* genutzt wird. Das liegt darin begründet, dass das in der Glykolyse produzierte *NADH* an sich nur auf zwei Wegen abgebaut werden kann: über Fermentierung und in der Atmungskette. Ethanolexport hätte allerdings zur Folge, dass pro Mol aufgenommener Glucose mehr Kohlenstoff exportiert wird, als es bei der Verarbeitung der Glucose durch Atmung der Fall ist. Dieser Kohlenstoff steht dann nicht mehr für die Produktion der Biomassekomponente über den Citratzyklus zur Verfügung, so dass die jeweilige Produktionsrate der Biomassekomponente vermindert würde. Die Regeneration von NAD^+ mittels Respiration ist daher der effizientere Weg, was die Sauerstoffaufnahme und die daraus resultierende - an sich nutzlos erscheinende - Produktion von *ATP* erklärt.

Es lässt sich feststellen, dass es große Unterschiede zwischen den einzelnen Biomassekomponenten hinsichtlich ihres Bedarfs an *ATP* und *NADPH* gibt. Während beispielsweise die Polysaccharide $\beta(1,3)$ -D-Glucan und Mannan netto kein *NADPH* benötigen, braucht es für die Synthese von Lipiden, wie Ergosterol und Triglyceriden mit diesem Ansatz mehr *NADPH* als *ATP*.

4 Flussbilanzanalyse zu metabolischen Zyklen in Hefe

Metabolit	ATP_c	$NADPH_c$	ATP_m	$NADPH_m$	qNADPHS	R_ATPS3m	qO2	$\frac{J_{NADPH}}{J_{ATP}}$
Glu	0	0	0	0	0.8	0.6	-0.2	-1.33
Gly	-0.21	0	0	0	1.71	1.93	-0.64	-0.8
Gln	-0.4	0	-1.2	-0.4	1.6	0	0	-0.75
13DGlc	-2	0	0	0	0	0	0	0
Arg	-5	0	-2	0	0	0	0	0
Mannan	-2	0	0	0	0	0	0	0
Asp	0	-0.5	0	0	0	5.25	-1.75	0.1
Ala	0	0	0	0	0	0	0	n.d.
CMP	-1.22	-0.89	0	0	0	2.33	-1.11	0.25
Asn	-1.5	-2	0	0	0	5.25	-1.75	0.3
UMP	-0.67	-0.89	0	0	0	2.33	-1.11	0.3
Leu	-1	-0.67	0	0	0	1	-0.33	0.33
Ser	0	-2	0	0	0	6	-2	0.33
Trp	-2.25	-1.5	0	0	0	2.25	-0.75	0.33
Tyr	0	-0.6	0	0	0	1.8	-0.6	0.33
GMP	-2.25	-2.25	0	0	0	3.38	-1.12	0.4
His	-2.4	-2.4	0	0	0	3.6	-1.2	0.4
Phe	-1.2	-1.2	0	0	0	1.8	-0.6	0.4
dCMP	-1.22	-1.56	0	0	0	2.33	-1.11	0.44
dGMP	-2.25	-3	0	0	0	3.38	-1.12	0.53
dTMP	-0.5	-2.17	0	0	0	3.25	-1.33	0.58
Thr	0	-3.5	0	0	0	5.25	-1.75	0.67
Val	0	-1	0	-1	0	3	-1	0.67
Pro	-0.4	-0.8	-1.2	-0.4	0	0	0	0.75
Zymst	-3.33	-3.11	0	0	0	0	-1.11	0.93
Cys	-0.86	-6.29	0	0	0	5.57	-1.86	0.98
Met	-0.86	-7.14	0	0	0	5.57	-1.86	1.11
Ergst	-2.56	-3	0	0	0	0	-1.33	1.17
Ptdlino	-1.79	-2.24	0	0	0	0	-0.12	1.25
Pe	-2	-2.53	0	0	0	0	-0.13	1.26
Ps	-1.73	-2.47	0	0	0	0.16	-0.18	1.31
Pc	-1.43	-3.02	0	0	0	0.85	-0.39	1.32
Pa	-1.77	-2.61	0	0	0	0	-0.14	1.48
Lys	-1	-2	-1	-1	0	0	0	1.5
Triglyc	-1.68	-2.55	0	0	0	0	-0.14	1.51
Ile	0	-4	0	-1	0	3	-1	1.67

Tabelle 4.2: Raten der virtuellen Transporter für ATP und $NADPH$ ins Cytosol und ins Mitochondrium (ATP_c , $NADPH_c$, ATP_m , $NADPH_m$), des basalen Verbrauchs von $NADPH$ ($qNADPHS$), der Produktionsrate für ATP im Mitochondrium (R_ATPS3m) und der Sauerstoffaufnahme ($qO2$), die sich ergeben, wenn die Produktionsraten einzelner Biomassekomponenten maximiert werden. Alle Raten sind in der Einheit $\frac{mmol}{h \cdot g}$ angegeben; die Glucoseaufnahme beträgt jeweils $1 \frac{mmol}{h \cdot g}$. Negative Werte bezeichnen dabei Aufnahme des entsprechenden Metaboliten. Das Verhältnis von $NADPH$ -Verbrauch zu ATP -Verbrauch ist hingegen einheitenlos; bei der Berechnung des selbigen geht R_ATPS3m als negativer Wert ein, da das über diese Reaktion erzeugte ATP ebenfalls für die Biosynthese verbraucht wird.

4.6 Maximierung von Produktionsraten einzelner Biomassekomponenten

Wie in Kapitel 3.4 dargestellt, kann es bezüglich der Produktionsrate von Biomasse effizienter sein zwischen Stoffwechselwegen, die unterschiedliche Anforderungen an das Reaktionsmilieu haben, hin- und herzuschalten. Wenn nun bestimmte Metabolite sehr unterschiedliche Anforderungen bezüglich des Verhältnisses von *NADPH* zu *ATP* haben, kann es ebenfalls gewinnbringend sein, diese zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu produzieren, was im nachfolgenden Abschnitt näher betrachtet ist.

4.6.1 Produktionsraten einzelner Biomassekomponenten in Abhängigkeit der Austauschraten

Die Resultate aus dem letzten Abschnitt - im Zusammenhang mit den in Kapiteln 3.4 und 4.5.4 gewonnenen Erkenntnissen - lässt den Schluss zu, dass es für das Wachstum der Zelle von Vorteil sein könnte, Biomassekomponenten, die einen ähnlichen Bedarf an Co-Faktoren haben, auch im selben Zeitabschnitt zu synthetisieren, während diejenigen Biomassekomponenten, die einen davon abweichenden Bedarf an Co-Faktoren aufweisen, zu einem anderen Zeitpunkt gebildet werden. In diesem Abschnitt wird die Abhängigkeit der Produktionsraten von einzelnen Biomassekomponenten von den gemessenen Austauschraten für Glucose, Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid untersucht. Dafür wird in jedem Zeitpunkt des Zyklus die Produktionsrate jeder der Biomassekomponenten mittels FBA maximiert, wobei die Glucoseaufnahmerate, die Sauerstoffaufnahmerate und die Kohlenstoffdioxidabgaberate festgesetzt sind; die Akkumulation aller Intermediate ist gestattet.

Es soll dabei ermittelt werden, welche der Biomassekomponenten ihr jeweiliges Maximum der Produktionsrate im selben Zeitpunkt verzeichnen, ob und inwieweit dies mit der Tabelle 4.2 im Einklang ist und ob eine biologisch sinnvolle zeitliche Ordnung von Produktionsschritten festgestellt werden kann.

In Tabelle 4.3 sind die Resultate dargestellt. Die maximalen Raten werden dabei in vier verschiedenen Zeitpunkten erzielt, wovon drei in der späten reduktiven beziehungsweise in der zeitigen oxidativen Phase zu finden sind und einer - der von Ergosterol - in der späten oxidativen Phase. Es zeigt sich also deutlich, dass die Austauschraten einen sehr starken Effekt auf die jeweiligen Produktionsraten haben. Keine der Biomassekomponenten kann bei maximaler Sauerstoffaufnahmerate - in den Zeitpunkten vier, fünf und sechs - mit der Maximalrate produziert werden, obwohl in dieser Phase die maximale Produktionsrate für *ATP* erzielt werden kann (Abbildung 4.15). Allerdings erreicht in diesem Abschnitt die *NADPH*-Produktionsrate ihr Minimum, das somit der Biosynthese nicht in ausreichendem Maße zur Verfügung stehen mag (Abbildung 4.15).

Der in Abbildung 4.18 verdeutlichte Kompromiss, der zwischen der Produktionen von *ATP* und *NADPH* getroffen werden muss, führt offenbar dazu, dass die Biomassekomponenten nicht in den Phasen, wo eine der beiden Komponenten am besten produziert werden kann, synthetisiert werden, sondern in den Übergängen zwischen

4 Flussbilanzanalyse zu metabolischen Zyklen in Hefe

Metabolit	v_{max1}	T_{max1}	v_{max2}	T_{max2}	v_{max3}	T_{max3}	v_{min1}	T_{min1}	v_{min2}	T_{min2}	v_{min3}	T_{min3}
Glu	0.96	12	0.94	11	0.94	1	0.71	4	0.76	5	0.78	6
Gly	2.39	12	2.35	11	2.35	1	2.06	9	2.08	7	2.1	10
Gln	0.96	12	0.94	11	0.94	1	0.71	4	0.76	5	0.78	6
13DGlc	0.8	12	0.78	11	0.78	1	0.53	4	0.57	5	0.58	6
Mannan	0.8	12	0.78	11	0.78	1	0.53	4	0.57	5	0.58	6
Ala	1.6	12	1.57	11	1.57	1	1.07	4	1.14	5	1.16	6
Asp	1.2	12	1.18	11	1.17	11	1.04	7	1.06	8	1.07	9
Tyr	0.53	12	0.52	11	0.52	1	0.34	4	0.36	5	0.37	6
Phe	0.53	12	0.52	11	0.52	1	0.32	4	0.34	5	0.35	6
Thr	1.2	12	1.18	11	1.17	11	0.8	4	0.85	5	0.87	6
Val	0.96	12	0.94	11	0.94	1	0.53	4	0.57	5	0.58	6
Pro	0.96	12	0.94	11	0.94	1	0.58	4	0.62	5	0.63	6
Lys	0.8	12	0.78	11	0.78	1	0.46	4	0.49	5	0.5	6
Ile	0.8	12	0.78	11	0.78	1	0.43	4	0.45	5	0.47	6
Trp	0.43	1	0.42	2	0.4	12	0.28	4	0.3	5	0.3	9
Met	0.66	1	0.63	2	0.62	12	0.36	4	0.38	5	0.39	6
Ptdlino	0.11	1	0.11	12	0.1	2	0.06	4	0.06	5	0.06	6
Pe	0.12	1	0.11	8	0.11	12	0.06	4	0.07	5	0.07	6
Ps	0.11	1	0.11	8	0.11	2	0.06	4	0.07	5	0.07	6
Pa	0.12	1	0.12	8	0.12	12	0.06	4	0.07	5	0.07	6
Triglyc	0.08	1	0.08	8	0.08	12	0.04	4	0.05	5	0.05	6
Zymst	0.12	2	0.11	7	0.11	3	0.04	10	0.04	9	0.06	11
Cys	0.67	2	0.66	1	0.62	12	0.38	4	0.4	5	0.41	6
Pc	0.09	2	0.09	1	0.09	8	0.05	4	0.06	5	0.06	6
Arg	0.78	2	0.74	3	0.7	8	0.39	9	0.4	10	0.47	11
AMP	0.39	2	0.39	3	0.36	5	0.19	9	0.19	10	0.23	11
CMP	0.52	2	0.51	3	0.47	8	0.28	9	0.29	10	0.33	11
Asn	1.17	2	1.16	3	1.13	1	0.71	9	0.73	10	0.84	11
UMP	0.52	2	0.51	3	0.48	1	0.3	9	0.31	10	0.36	11
Leu	0.76	2	0.74	1	0.7	8	0.43	4	0.45	5	0.47	6
Ser	1.56	2	1.54	3	1.4	6	1.05	9	1.07	10	1.17	11
GMP	0.39	2	0.39	3	0.37	4	0.18	9	0.18	10	0.21	11
His	0.58	2	0.58	3	0.53	6	0.26	9	0.26	10	0.31	11
dCMP	0.52	2	0.51	3	0.47	8	0.28	9	0.29	10	0.33	11
dGMP	0.39	2	0.39	3	0.36	5	0.18	9	0.18	10	0.21	11
dTMP	0.39	2	0.38	1	0.37	3	0.23	9	0.24	10	0.28	11
dAMP	0.39	2	0.39	3	0.36	5	0.19	9	0.19	10	0.23	11
Ergst	0.11	7	0.11	3	0.1	2	0.03	10	0.03	9	0.05	11

Tabelle 4.3: Die drei höchsten und drei niedrigsten Produktionsraten (v_{max_i} beziehungsweise v_{min_i} ; gerundet auf zwei Dezimalstellen) für einzelne Biomassekomponenten und den dazugehörigen Messpunkten (T_{max_i} beziehungsweise T_{min_i}). Alle Raten sind in der Einheit $\frac{mmol}{h \cdot g}$ angegeben. Die Austauschraten für Glucose, Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid sind festgesetzt; die Akkumulation aller Intermediate ist erlaubt.

4.6 Maximierung von Produktionsraten einzelner Biomassekomponenten

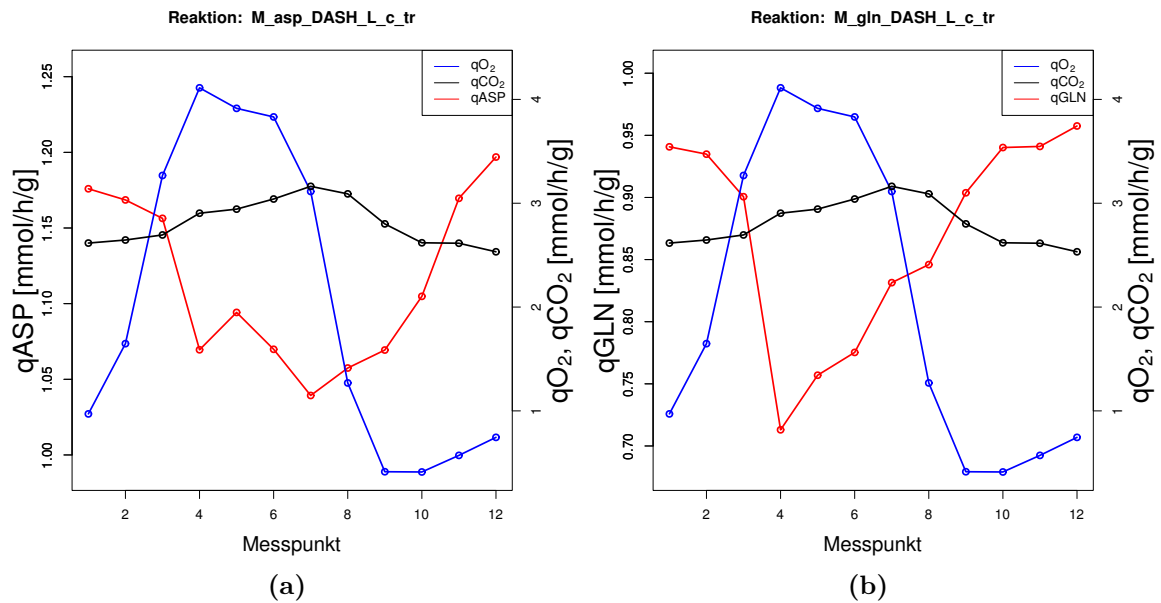


Abbildung 4.19: Die optimalen Produktionsraten von Aspartat und Glutamin in Abhängigkeit der Austauschraten für Glucose, Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid.

beiden Phasen.

Es sollen an dieser Stelle nicht für alle Biomassekomponente die Abhängigkeit der Syntheseraten von den Austauschflüssen dargestellt werden, aber zumindest sechs Repräsentanten der jeweiligen Phasen, die auch später für eine mögliche biologische Interpretation von Belang sind (Kapitel 4.6.2); die von weiteren Biomassekomponenten finden sich in Anhang C.

Abbildung 4.19 zeigt die optimalen Bildungsraten zu jedem Zeitpunkt des Zyklus der beiden Aminosäuren Aspartat und Glutamin, die beide in der späten reduktiven Phase ihre höchsten Produktionsraten aufweisen (Tabelle 4.3). Beide haben auch einen sehr ähnlichen Bedarf von *NADPH* und *ATP* (Tabelle 4.2). Anschließend weisen bestimmte Lipide und zwei Aminosäuren ihre maximale Produktionsrate auf (Tabelle 4.3); Abbildung 4.20 zeigt dafür stellvertretend die optimalen Produktionsraten für Triglyceride und Methionin. Beide können noch zu einem weiteren Zeitpunkt mit hoher Rate produziert werden, im Zeitpunkt acht. Dies ist der Zeitpunkt, zu dem auch *NADPH* seine höchste Bildungsrate aufweist (Abbildung 4.15). Sowohl Lipide als auch die schwefelhaltigen Aminosäuren haben einen hohen Bedarf an *NADPH* (Tabelle 4.2), der im Falle der Aminosäuren auf die Sulfatverarbeitung zu Schwefelwasserstoff zurückzuführen ist. Somit ist auch erklärbar, warum diese Metabolite bei maximaler Sauerstoffaufnahme - in den Zeitpunkten vier, fünf und sechs - ihre minimale Produktionsrate besitzen (Tabelle 4.3). In diesen Zeitpunk-

4 Flussbilanzanalyse zu metabolischen Zyklen in Hefe

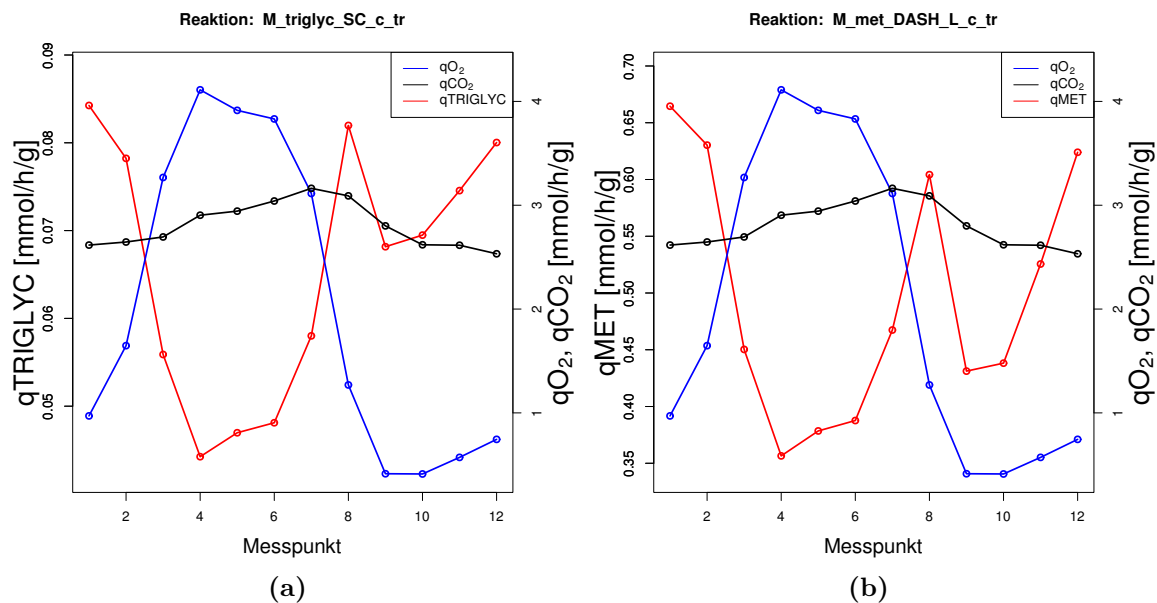


Abbildung 4.20: Die optimalen Produktionsraten von Triglyceriden und Methionin in Abhängigkeit der Austauschraten für Glucose, Sauerstoff und Kohlendioxid.

ten ist zwar die Produktionsrate für *ATP* maximal, die für *NADPH* aber minimal (Abbildung 4.15).

Im Übergang von der reduktiven zur oxidativen Phase verzeichnen sämtliche Nukleotide ihre maximale Bildungsrate (Tabelle 4.3), wie z.B. *UMP* und *dGMP*, die hier stellvertretend ausgewählt wurden (Abbildung 4.21). Wie auch aus Tabelle 4.3 ersichtlich ist, besitzen sämtliche Nukleotide sowohl die maximale als auch die minimale Produktionsrate jeweils im selben Zeitpunkt. Nukleotide lassen sich in der oxidativen Phase mit deutlich höheren Raten produzieren als in der reduktiven; der Bedarf von *NADPH* und *ATP* (Tabelle 4.2) liegt zumindest für die Desoxynukleotide in einem sehr ähnlichen Bereich.

Sämtlichen Resultaten ist gemein, dass es erneut ein Umschalten zwischen dem Citratzyklus und dem Pentose-Phosphat-Weg gibt. Abbildung 4.22 zeigt die beiden diese Stoffwechselwege repräsentierenden Raten (vergleiche Abschnitt 4.5.3) für zwei Biomassekomponenten, für $\beta(1,3)$ -D-Glucan und Zymosterol.

Während $\beta(1,3)$ -D-Glucan aus dem Glykolyseintermediat Glucose-6-Phosphat gebildet wird, entsteht Zymosterol aus Acetyl-CoA; die jeweiligen Synthesewege zeigen also keine große Schnittmenge auf und auch der Bedarf an *ATP* und *NADPH* ist stark unterschiedlich (Tabelle 4.2). Dennoch lässt sich beobachten, dass die Raten des Citratzyklus und des Pentose-Phosphat-Weges sehr ähnliches Verhalten aufweisen, in beiden Fällen sind die Raten auch phasenversetzt aktiv, was sich in der Tat für alle

4.6 Maximierung von Produktionsraten einzelner Biomassekomponenten

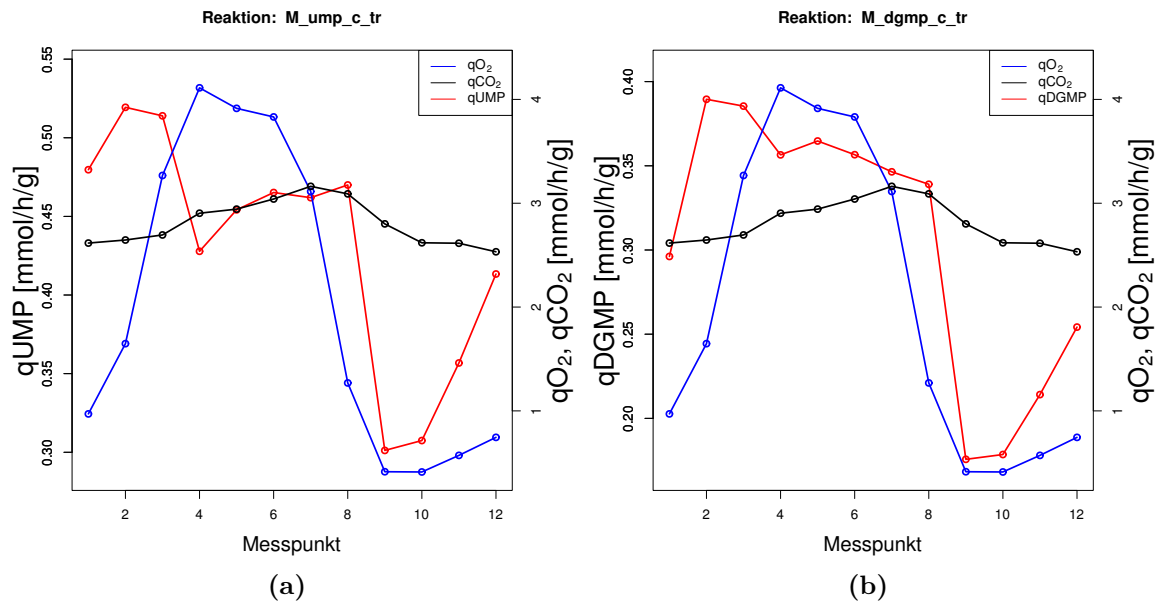


Abbildung 4.21: Die optimalen Produktionsraten von UMP und dGMP in Abhängigkeit der Austauschraten für Glucose, Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid.

untersuchten Biomassekomponenten feststellen lässt.

Dies legt einmal mehr den Schluss nahe - wie schon bei der Optimierung auf die Gesamtbiomassefunktion - dass die Austauschraten für Glucose, Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid ein Umschalten zwischen Citratzyklus und Pentose-Phosphat-Weg abbilden.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.23 zusammengefasst. Die dort ersichtliche zeitliche Abfolge der maximalen Bildungsrate einzelner Biomassekomponenten ist im Abschnitt 4.6.2 diskutiert.

4 Flussbilanzanalyse zu metabolischen Zyklen in Hefe

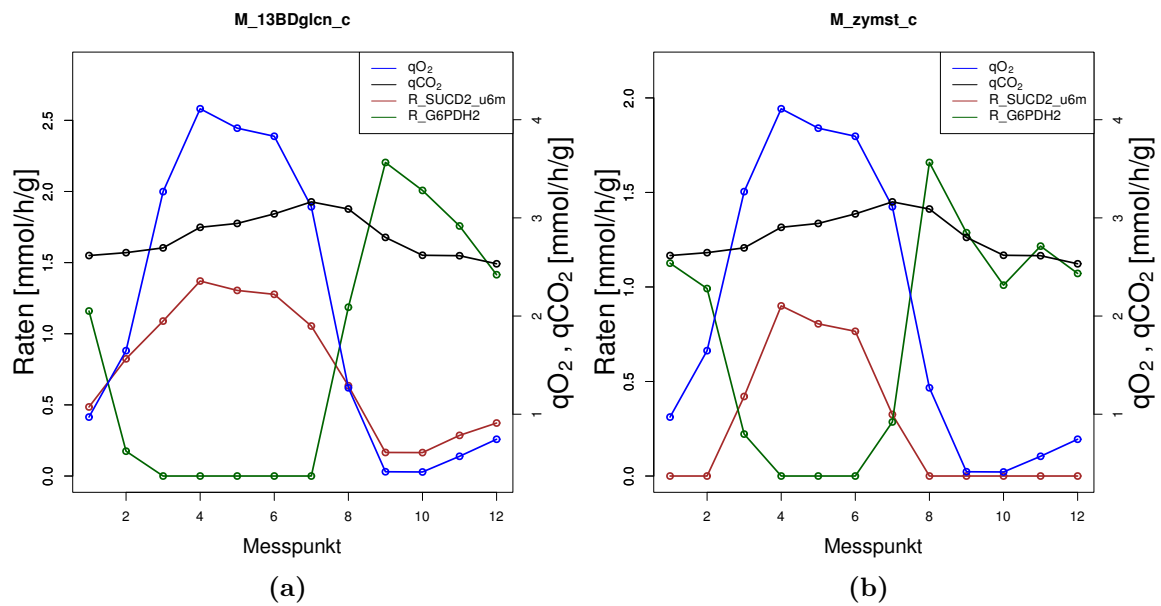


Abbildung 4.22: Die Raten der ersten Reaktion des Pentose-Phosphat-Weges, R_G6PDH2, und die Reaktion, die Succinat zu Fumarat umwandelt, was im Citratzyklus geschieht, R_SUCD2_u6m. Während der Pentose-Phosphat-Weg während der reduktiven Phase aktiv und in der oxidativen Phase inaktiv ist, verzeichnet der Citratzyklus seine höchste Aktivität während der oxidativen und die geringste Aktivität während der reduktiven Phase.

4.6 Maximierung von Produktionsraten einzelner Biomassekomponenten

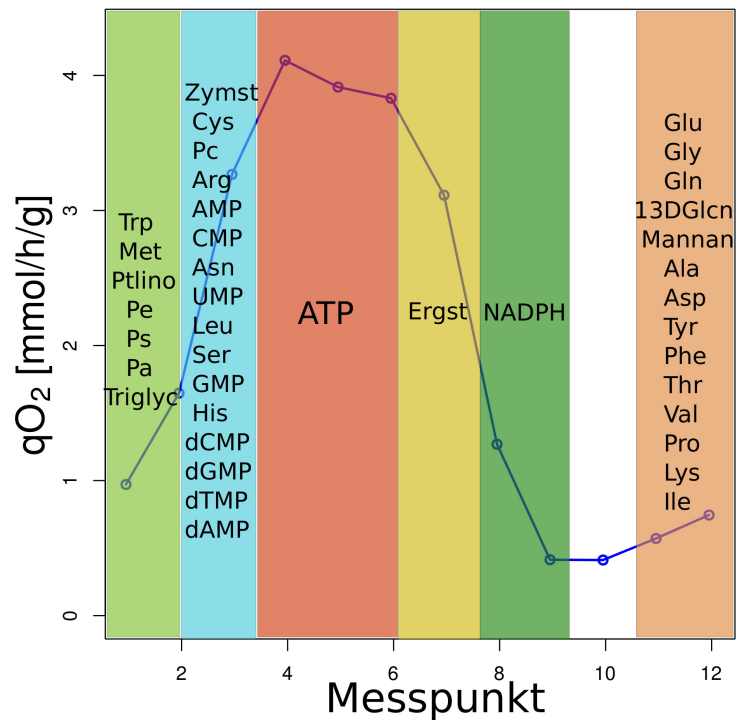


Abbildung 4.23: Zeitliche Abfolge der optimalen Produktionsraten der Biomassekomponenten über den Zyklus. Von Ergosterol abgesehen zeigen sämtliche Biomassekomponenten ihre maximale Produktionsrate im Übergang von der reduktiven zur oxidativen Phase. Die maximale Produktionsrate für *ATP* wird dabei für hohe Sauerstoffaufnahmezeiten erzielt, während die höchstmögliche Produktionsrate von *NADPH* mit niedrigen Sauerstoffaufnahmezeiten assoziiert ist.

4.6.2 Zeitliche Ordnung in der Biosynthese von Biomassekomponenten?

In verschiedenen experimentellen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Replikation der DNA in der Phase stattfindet, in der eine geringe Sauerstoffaufnahme zu verzeichnen ist. Daher wurde die zeitliche Trennung der DNA-Replikation von Respiration als Hauptfunktion der respiratorischen Oszillationen in Hefe angesehen [9, 54, 117].

Hintergrund ist, dass über Respiration nicht nur Energie für die Zelle in Form von *ATP* bereitgestellt wird, sondern auch toxische Substanzen wie ROS produziert werden, die DNA schädigen können. Dies führte zu der Annahme, dass es von evolutionärem Vorteil sei, auf eine Phase hoher Sauerstoffaufnahme beziehungsweise hoher respiratorischer Aktivität eine Phase niedriger Sauerstoffaufnahme, in der der Effekt toxischer Nebenprodukte minimal ist, folgen zu lassen und somit die Unversehrtheit des Genoms zu gewährleisten, wenn selbiges repliziert wird.

Diese Idee findet in den hier präsentierten Ergebnissen durchaus Unterstützung. In der späten reduktiven Phase können die beiden Aminosäuren Aspartat und Glutamin mit maximaler Rate produziert werden (Tabelle 4.3, Abbildung 4.23). Beide sind für die Bildung von Pyrimidinen vonnöten, die wiederum für die Synthese von RNA und DNA verwendet werden. Sämtliche Nukleotide, die für die Synthese von RNA und DNA notwendig sind, verzeichnen im Übergang von der reduktiven zur oxidativen Phase ihre maximalen Produktionsraten (Tabelle 4.3, Abbildungen 4.23) und können während der gesamten oxidativen Phase mit hohen Raten produziert werden (Abbildung 4.21), während sie ihre geringsten Bildungsraten in der reduktiven Phase aufweisen. In der oxidativen Phase ist die maximale Produktion von *ATP* möglich (Abbildungen 4.15 und 4.23), woran sich die höchste Produktionsrate für *NADPH* anschließt (Abbildungen 4.15 und 4.23).

Diese Abfolge lässt sich dahingehend interpretieren, dass in der späten reduktiven und in der zeitigen oxidativen Phase die Vorläufer für die Biomasseproduktion und die Voraussetzungen für die Replikation der DNA geschaffen werden. Die in dem sich anschließenden Abschnitt des Zyklus hohen Produktionsraten an *ATP* könnten dann als Auslöser für die eigentliche DNA-Synthese fungieren, da so garantiert ist, dass sie vollständig und zügig ablaufen kann [26].

An diese Phase maximaler Sauerstoffaufnahme, die mit maximaler Produktion von *ATP* einhergeht, schließt sich die Phase an, in der *NADPH* die maximale Bildungsrate zu verzeichnen hat (Abbildungen 4.15 und 4.23); die Detoxifizierung der Zelle kann in dieser Phase also besonders gut vonstatten gehen. In diesem Zeitabschnitt findet zudem die Replikation der DNA statt [54], die somit in einem reduzierten Milieu ablaufen kann, womit die Unversehrtheit des Genoms gewährleistet wird.

Weiterhin lässt sich beobachten, dass Biomassekomponenten mit ähnlichem Bedarf an *ATP* und *NADPH* auch in denselben Zeitpunkten des Zyklus ihre jeweiligen maximalen Produktionsraten aufweisen (Tabellen 4.2 und 4.3 und Abbildung 4.23), was

mit dem im Kapitel 3.4 dargelegten Szenario kompatibel ist. Sowohl *ATP* als auch *NADPH* werden für die Produktion von Biomasse benötigt, deren Produktionsraten aber nicht unabhängig voneinander sind (Abbildungen 4.18 und 4.15). Wie in Kapitel 3.4 gezeigt ist, kann es effektiver sein, Metabolite mit einem ähnlichen Bedarf an Co-Faktoren zeitgleich zu produzieren und wenn sich der Bedarf der Co-Faktoren unterscheidet, die Produktionsschritte zeitversetzt durchzuführen.

4.7 Zusammenfassung und weiterführende Arbeiten

In diesem Kapitel ist mittels Flussbilanzanalyse (FBA) untersucht, wie sich die experimentell bestimmten Raten für Glucoseaufnahme, Sauerstoffaufnahme und Kohlenstoffdioxidexport auf die Wachstumsrate und auf die Produktionsraten von Metaboliten, die für die Biomassesynthese essentiell sind, auswirken. Alle in den vorangegangenen Abschnitten präsentierten Ergebnisse beruhen dabei auf Einzelsimulationen mit Hilfe von Flussbilanzanalyse. So kann ermittelt werden, welche Flussverteilungen am besten zu welcher Kombination von Austauschraten passen, was gegebenenfalls Rückschlüsse auf die tatsächlich stattfindenden Stoffwechselreaktionen und damit auf eine biologisch relevante zeitliche Reihenfolge von Produktionsschritten zulässt.

Zunächst wird getestet, ob es - basierend auf den durchschnittlichen Austauschraten über einen Zyklus - möglich ist, mit Hilfe des gewählten Modells die experimentell festgelegte Wachstumsrate zu bestimmen. Dies ist in guter Näherung der Fall und kann bei entsprechender Wahl des basalen Verbrauchs von *ATP* - demjenigen *ATP*-Verbrauch, der nicht unmittelbar an Wachstumsprozess gekoppelt ist - auf den exakten Wert angepasst werden. Im nächsten Schritt wird untersucht, wie die optimale Wachstumsrate von den dynamischen Austauschraten abhängt. Dazu werden in jedem Messpunkt des Zyklus die Austauschraten fixiert und die Wachstumsrate maximiert. Müssen sämtliche Metabolite bilanziert sein, wie es bei der "klassischen" FBA angenommen wird, lassen sich in den Punkten maximaler und minimaler Sauerstoffaufnahme keine gültigen Lösungen finden. Dem wird mittels einer Hilfsannahme Rechnung getragen, die darin besteht, dass das System Stoffe überproduzieren darf. So müssen zwar nach wie vor alle für das notwendigen Stoffe für die jeweilige Synthese produziert, diese aber nicht mehr bilanziert sein. Durch diesen zusätzlichen Freiheitsgrad ist es nun möglich, in jedem Zeitpunkt des Zyklus eine gültige Lösung für die Biomasseproduktion zu berechnen. In der oxidativen Phase ist dabei eine Akkumulation von Carbamoylphosphat zu beobachten, während in der reduktiven Phase eine Überproduktion von *NADPH* zu verzeichnen ist.

Darüber hinaus wird die Biosynthese einzelner Biomassekomponenten betrachtet. Dafür wird zunächst der Bedarf von *NADPH* und *ATP* ermittelt, die für die jeweilige optimale Synthese vonnöten ist. Anschließend werden mittels FBA die maximalen Syntheseraten für jede einzelne Biomassekomponente in Abhängigkeit der experimentell bestimmten Raten für Glucoseaufnahme, Sauerstoffaufnahme und Kohlenstoffdioxidexport ermittelt. Es zeigt sich, dass Metabolite, die einen ähnlichen Bedarf an

4 Flussbilanzanalyse zu metabolischen Zyklen in Hefe

NADPH/ATP haben, auch zu ähnlichen Zeitpunkten des Zyklus die maximalen Syntheseraten aufweisen.

Auch sieht man eine zeitliche Abfolge der Maxima der optimalen Produktionsraten der einzelnen Biomassekomponenten, was gegebenenfalls auf ein zeitlich koordiniertes Programm der Biosynthese hindeutet. In der späten reduktiven Phase zeigen zunächst die Vorläufer der Nukleotidsynthese ihre maximale Produktionsrate, anschließend sämtliche Nukleotide, die für die Synthese von RNA und DNA benötigt werden, daraufhin *ATP* und *NADPH*.

Es lässt sich also spekulieren, dass in der oxidativen Phase alle Voraussetzungen für eine erfolgreiche Replikation der DNA und Zellteilung geschaffen werden, wobei die hohen Produktionsraten für *ATP* in der oxidativen Phase notwendig sein könnten, um sicherzustellen, dass diese vollständig und zügig ablaufen kann. Die anschließend hohen Produktionsraten für *NADPH* lassen eine effiziente Detoxifizierung der Zelle zu, was zum Schutz der Unversehrtheit des Genoms beiträgt.

Unabhängig von der jeweiligen Zielfunktion ist stets ein Umschalten zwischen der Aktivität des Citratzyklus und der des Pentose-Phosphat-Weges zu beobachten, wobei der Citratzyklus während der oxidativen Phase und der Pentose-Phosphat-Weg in der reduktiven Phase die höchste Aktivität aufweist. Dies deutet darauf hin, dass die metabolischen Zyklen eine zeitlich koordinierte Produktion von *ATP* und *NADPH* repräsentieren beziehungsweise eine zeitliche Trennung von Biosynthese und Stressantwort, wie sie auch für Genexpressionsdaten beschrieben ist [67]. Das biosynthetische Programm wird dabei mit steigender respiratorischer Aktivität initialisiert, was sich auch in experimentellen Studien findet [77].

Die Tatsache, dass ein bestimmter Metabolit zu einem bestimmten Zeitpunkt des Zyklus - gegeben lediglich drei fixierte Austauschraten - mit hoher Rate produzierbar ist, lässt natürlich keinen gesicherten Schluss zu, dass diese Produktion auch tatsächlich stattfindet, sondern kann bestenfalls ein Hinweis auf selbige sein. Um die Resultate noch besser einordnen zu können, ist ein Vergleich mit experimentellen Daten zwingend notwendig; die Voraussetzungen, dass ein solcher durchgeführt werden kann, ist mit dem Experiment aus dem Kapitel 2.1 geschaffen.

Mit dem hier gewählten Ansatz der Analyse lassen sich Dynamiken nur in einem sehr beschränkten Maße abbilden. Dies könnte durch Anwendung von dynamischer Flussbilanzanalyse, die eine konsequente Weiterführung der hier dargelegten Analysen ist, geschehen. Angenommen werden könnte, dass Metabolite also nicht nur überproduziert, sondern zu einem späteren Zeitpunkt auch wieder aufgenommen werden können, was insbesondere hinsichtlich der experimentell beobachteten Wiederverwertung von Ethanol nützlich wäre. Als Zielfunktion könnte die Biomasseproduktion über den gesamten Zyklus hinweg dienen, die somit nicht mehr in jedem Zeitpunkt des Zyklus produziert werden muss. Intermediate - entweder alle oder speziell ausgewählte - müssen nur über den gesamten Zyklus hinweg bilanziert sein, oder können auch akkumuliert werden, was eine Überproduktion selbiger zu bestimmten Zeitpunkten des Zyklus erlaubt sowie deren Verbrauch zu einem anderen Zeitpunkt. Die erhaltenen Lösungen werden nicht

4.7 Zusammenfassung und weiterführende Arbeiten

eindeutig, die Variabilität sehr hoch sein. Auch lassen sich damit keine Aussagen über Regulationsstrukturen innerhalb des Netzwerkes treffen. Dennoch kann so eine optimale Abfolge von Produktionsschritten für die Synthese der Biomassekomponenten ermittelt werden, die sich dann mit den experimentell bestimmten Daten abgeglichen werden kann.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Diese Arbeit beschäftigt sich mit einem Phänomen, das in Hefekulturen beobachtbar ist. Wenn Hefe in einer kontinuierlichen Kultur wächst, synchronisieren die Zellen und zeigen eine stabile respiratorische Oszillation. Sowohl weite Teile des Transkriptoms als auch des Metaboloms oszillieren in klaren Phasenbeziehungen zu dieser sich ändernden respiratorischen Aktivität. Die diesen Dynamiken zugrunde liegenden Mechanismen sind ebenso ungeklärt wie deren möglicher funktioneller Aspekt.

In dieser Arbeit werden die metabolischen Zyklen daher mittels experimenteller und theoretischer Methoden näher beleuchtet und analysiert. Dazu wird ein Experiment durchgeführt, bei dem ^{13}C -markierte Glucose als Kohlenstoffquelle dient, deren Umbau nachverfolgt werden kann. Ein solches Experiment ist die Grundlage der Bestimmung zeitaufgelöster Flussdaten, die erlauben, die Aktivitätsprofile einzelner Stoffwechselwege zu bestimmen, was Rückschlüsse auf vorhandene regulatorische Mechanismen zulässt. Wenngleich diese Flussdaten mit Abschluss der Arbeit noch nicht verfügbar sind, konnte mit den bisher vorliegenden Daten gezeigt werden, dass sich die Konzentration eines Intermediates des Methylcitratzyklus in einer festen Phasenbeziehung zur respiratorischen Aktivität ändert. Da der Methylcitratzyklus in den Lipidabbau involviert ist, motivierte dieser Befund ein weiteres Experiment. Dieses besteht in der Ermittlung der Dynamik des Lipidoms. In dieser Arbeit wird zum ersten Mal gezeigt, dass auch das Lipidom der Zellen oszillatorisches Verhalten aufweist. Dabei gibt es eine Gruppe an Lipiden, die ihre höchsten Konzentrationen in der Phase hoher Sauerstoffaufnahme zeigt und eine andere Gruppe, für die das in der Phase niedriger Sauerstoffaufnahme zu beobachten ist. Die Identifikation der einzelnen Lipide steht noch aus, so dass über eine biologische Bedeutung an dieser Stelle nur spekuliert werden kann. Da Lipide sowohl in den Energiestoffwechsel involviert als auch für Strukturgebung vonnöten sind, könnte dieser Befund ein Umschalten von energiebereitstellenden zu strukturgebenden Prozessen repräsentieren.

Aus diesen Ergebnissen ergeben sich Ansätze für weitergehende Studien. So lässt sich mit diesen hier dargelegten Experimenten der auf Glucoseaufnahme basierende Kohlenstofffluss ermitteln. Es ist jedoch bekannt, dass *Saccharomyces cerevisiae* auch zur Fixierung von Kohlenstoffdioxid in der Lage ist [85], was eine weitere potentielle Kohlenstoffquelle darstellt. Diese Fixierung von Kohlenstoffdioxid kann mittels der anaplerotischen Reaktion von Pyruvat zu Oxalacetat erfolgen [88], das dann im Wesentlichen in drei Stoffwechselwege eingespeist werden könnte: in den Citratzyklus, den Methylcitratzyklus und in die Gluconeogenese. Ob es zu einer Fixierung von Kohlenstoffdioxid kommt und über welche Stoffwechselwege selbiges schlussendlich nutzbar gemacht wird, kann ein weiteres Markierungsexperiment zeigen. Dieses wird analog

5 Zusammenfassung und Ausblick

zu dem in Abschnitt 2.1 beschriebenen durchgeführt, wobei nicht Glucose über ^{13}C markiert ist, sondern Kohlenstoffdioxid. Aus dem zeitaufgelösten Messen des Kohlenstoffflusses basierend auf Glucoseaufnahme und einer gegebenenfalls stattfindenden Kohlenstoffdioxidfixierung sowie der gleichzeitigen Analyse des Lipidabbaus über den Methylcitratzyklus wird es möglich sein, generelle Organisationsprinzipien des zellulären Metabolismus abzuleiten, existierende Modelle zu validieren und zu erweitern.

Da die Frage nach der Ursache der Oszillationen noch nicht geklärt ist, werden vier Szenarien betrachtet, die als Erklärungsansatz für das Auftreten dieserart Dynamiken dienen können. Aufgrund der Komplexität des Netzwerkes ist es denkbar, dass es sich um einen rein mechanistischen Effekt - beruhend auf einer negativen Rückkopplung und einer intrinsischen Zeitverzögerung - ohne eine unmittelbare Funktion für die Zelle handelt. Weiterhin könnten diese Oszillationen die sich zeitlich ändernden physiologischen Anforderungen eines Prozesses, der in einer gegebenen Ordnung abzufließen hat, widerspiegeln; ein Beispiel dafür ist der Zellzyklus [26]. Die Szenarien drei und vier werden unter Verwendung von generischen Minimalsystemen mittels *in-silico* Evolution untersucht. Dieser Ansatz erlaubt es, für festgelegte Stöchiometrien sowohl optimale Ratenkonstanten als auch geeignete Regulationsstrukturen zu bestimmen [30], wobei die Zielfunktion in dieser Arbeit durch die akkumulierte Biomasse in einem bestimmten Zeitbereich repräsentiert ist. Für beide der untersuchten Systeme kann gezeigt werden, dass oszillatorische Lösungen die Biomasseproduktion in erheblichen Maße steigern können. In Szenario drei beruht dieser Fitnessvorteil darauf, dass die Produktion toxischer Nebenprodukte von der Produktion derjenigen Stoffe, die durch selbige geschädigt werden, zeitlich getrennt werden kann und verkörpert somit einen der ersten Erklärungsversuche, warum diese Oszillationen als für den Organismus vorteilhaft sein könnten [9, 54, 117]. Ein solcher Fitnessvorteil für die Zelle kann auch zustande kommen, indem zwischen unterschiedlichen Reaktionsmilieus umgeschaltet wird, was das vierte Szenario darstellt. Trotzdem diese zeitliche Ordnung von Stoffwechselaktivität dazu führt, dass bestimmte Teile des Netzwerkes für einen gewissen Zeitraum inaktiv sind, kann eine Effizienzsteigerung erzielt werden, da die Reaktionen unter den für sie optimalen Bedingungen ablaufen können. Die alternierende Aktivität von Stoffwechselwegen in dem für sie besten Reaktionsmilieu kann also gegenüber der Optimierung des Gesamtprozesses zu deutlichen Fitnessvorteilen führen. Werden dieselben Systeme in derselben Umgebung evolviert, aber ohne die Möglichkeit zu haben, ihren Stoffwechsel zu regulieren, fällt die Biomasseproduktion deutlich geringer aus. Die untersuchten Systeme sind derart allgemein gestaltet, dass sie auch zum Verständnis anderer periodischer Phänomene beitragen können, die mit der Notwendigkeit zur Detoxifizierung in Verbindung gebracht werden, wie zum Beispiel zirkadiane Rhythmen [19] und Schlaf [41, 130, 132].

Die verwendeten Methodiken können in einer Anschlussarbeit auf ein realistischeres Modell für den zentralen Kohlenstoffmetabolismus (Abbildung 3.10) angewendet werden, um mögliche Mechanismen, auf denen die beobachteten Dynamiken beruhen, zu detektieren. Ein häufig diskutierter Mechanismus, wonach die Oszillationen auf einen zyklischen Auf- und Abbau von Kohlenhydratspeichern zurückzuführen sind

[26, 97, 131], was zu einer Änderung des glykolytischen Flusses führt, ist unzureichend, da sich die Oszillationen auch dann beobachten lassen, wenn Ethanol die Kohlenstoffquelle darstellt, dadurch keine glykolytische Aktivität vorhanden und keine Oszillation der Konzentrationen der Kohlenhydratspeicher beobachtbar ist [51]. Mit Hilfe von *in-silico* Evolution ließe sich gegebenenfalls eine Regulationsstruktur ermitteln, die als Erklärung für die Oszillationen auf beiden Medien dienen könnte.

Unter Verwendung der experimentell bestimmten Austauschraten für Glucose, Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid wird mittels Flussbilanzanalyse untersucht, wie sich die optimalen Syntheseraten von Biomasse und die der für Biomasseproduktion notwendigen Vorläufer über den Zyklus hinweg ändern. Derart kann ermittelt werden, welche Flussverteilungen am besten zu welcher Kombination von Austauschraten passen, was gegebenenfalls Rückschlüsse auf die tatsächlich stattfindenden Stoffwechselreaktionen und damit auf eine biologisch relevante zeitliche Reihenfolge von Produktionsschritten zulässt. Unabhängig von der Zielfunktion kann stets ein Umschalten zwischen der Aktivität des Pentose-Phosphat-Weges und der des Citratzyklus beobachtet werden, wobei ersterer mit niedrigen und letzterer mit hohen Sauerstoffaufnahmeraten assoziiert ist. Weiterhin kann gezeigt werden, dass eine zeitliche Ordnung der maximalen Produktionsraten zu verzeichnen ist. Während die Biomassekomponenten ihre maximalen Bildungsraten beim Übergang zwischen reduktiver und oxidativer Phase - also mit steigender Atmungsaktivität - aufweisen, zeigt *NADPH* diese mit Beginn der reduktiven Phase, was jeweils mit experimentellen Daten kompatibel ist [77]. Es lässt sich also mutmaßen, dass die metabolischen Zyklen eine phasenversetzt ablaufende Produktion von *ATP* und *NADPH* repräsentieren beziehungsweise eine alternierende Abfolge von Biosynthese und Stressantwort. Diese Interpretation findet sich in Übereinstimmung mit einer Analyse von Genexpressionsdaten [67]. Dass eine solche zeitliche Trennung für den Organismus vorteilhaft sein könnte, ist aus den oben dargestellten auf einem evolutionären Algorithmus beruhenden Simulationen ersichtlich. In einer weiterführenden Arbeit ließe sich der hier gewählte Ansatz noch verfeinern. Bei den durchgeführten Analysen ist zwar die Überproduktion von Intermediaten gestattet, deren Mobilisierung zu einem späteren Zeitpunkt des Zyklus hingegen nicht implementiert. Diese ließe sich über dynamische Flussbilanzanalyse realisieren. So könnte die Biomasseproduktion über einen Zyklus als Zielfunktion dienen und zu jedem Zeitpunkt des Zyklus Metabolite gespeichert und später wieder verwendet werden. Wenngleich eine hohe Variabilität innerhalb der Lösungen zu erwarten ist, könnten so Vorhersagen für Flussverteilungen getroffen werden, die einen Vergleich mit gemessenen zulassen. Die Voraussetzungen, damit ein solcher Vergleich stattfinden kann, sind in dieser Arbeit sowohl von experimenteller Ebene über ein Markierungsexperiment als auch von theoretischer Seite her geschaffen.

A Ergänzendes Material zu Kapitel 2

A.1 Mediumzusammensetzung

Die Zusammensetzung des Nährmediums ist wie folgt:

D-Glucose: $20 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: $5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, KH_2PO_4 : $2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: $0.5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: $0.1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: $20 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, 70% H_2SO_4 : $1 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$, Difco Hefeextrakt: $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ und SigmaAntifoam A $0.2 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$.

Das zweite Nährmedium ist wie das erste Zusammengesetzt, mit dem Unterschied, dass es sich bei einem Drittel der Glucose um [U- ^{13}C]-Glucose und bei zwei Dritteln um [1- ^{13}C]-Glucose handelt.

A.2 Datenverarbeitung mit MZmine 2.10

Im Folgenden werden die Arbeitsschritte zur Erzeugung von Abbildung 2.5 dargestellt. Die Rohdatendokumente wurden dabei von Kazutaka Ikeda zur Verfügung gestellt, liegen im “mzXML”-Format vor und sind auf Anfrage erhältlich.

Nach dem Start des Programms “MZmine” (Version 2.10) [87] werden folgende Handlungen vorgenommen:

1. Man gehe zum Menüpunkt “Project”, wähle “Set preferences” und stellt folgende Werte ein:
“m/z value format”: 4
“Retention time value format”: 2
“Intensity format”: 2
Die Haken in “show exponent” und “use proxy” werden entfernt.
2. Die 24 Rohdatendokumente im Format “mzXML” werden geladen. Dazu geht man zu dem Menüpunkt “Raw data methods” und wählt “Import”.
3. Anschließend werden die Massen bestimmt:
“Raw data methods” -> “Peak Detection” -> “Mass detection”.
Dort wählt man:
“Mass detector”: Centroid.
“Noise level”: 250.
Über “Show preview” kann man sich anschauen, ob dieses zu hoch oder zu niedrig gewählt ist.

4. Aus diesen Massenlisten erstellt man nun die dazugehörigen Chromatogramme. Man wählt:
"Raw data methods" -> "Peak detection" -> "chromatogram builder". Bei "Choose" wählt man nun die eben generierten Massenlisten aus. Die weiteren Parameter sind:
"Min time span": 0.08
"Min height": 1000
"m/z tolerance": 0.25 or 30 ppm
Diese Berechnung ist unter Umständen sehr rechen- und zeitintensiv. In diesem Falle dauert sie zirka 12 Stunden, wobei die Rechnung parallelisiert ist und auf 6 Prozessoren läuft.
5. Dekonvolution der Peaks: "Peak list methods" -> "Chromatogram deconvolution". Als Algorithmus wird "local minimum search" gewählt. Die weiteren Parameter:
"chromatographic threshold": 90%
"search minimum in RT range": 0.08
"Minimum relative height": 1.5%
"Minimum absolute height": 1000
"Min ratio of peak top/edge": 1.25
"Peak duration range": 0.00 - 1.20
6. Um die Abweichungen zwischen den einzelnen peak-Listen zu minimieren, werden die externen Standards zur Normierung genutzt. Für jeden der drei Standards werden die Standardabweichungen für die jeweiligen m/z und RT bestimmt aus allen Peak-Listen. Diese nutzt man für die Normierung:
"Peak list methods" -> "Normalization" -> "Retention time normalizer".
Dort wählt man:
"m/z tolerance": 0.002
"Retention time tolerance": 0.5
"Minimum standard intensity": 10000
7. Ausrichtung/Gruppierung der Peak-Listen: "Peak list methods" -> "Alignment" -> "Join aligner".
Dort wählt man:
"m/z tolerance": 0.0055
"Weight for m/z": 1
"Retention time tolerance": 0.1
"Weight for RT": 1
Sollten in diesem Schritt nicht alle peaks der Standards detektiert worden sein, sollte man zu Punkt 4) gehen und es mit anderen Parametern versuchen. Für die hier angegebenen Parameter werden alle Standards detektiert.
8. Vervollständigen der Peak-Listen: Da die erhaltenen Peak-Listen teilweise Lücken aufweisen, werden diese gefüllt. Dazu wählt man:
"Peak list methods" -> "Gap filling" -> "Peak finder".

Dort werden folgende Parameter verwendet:

“Intensity tolerance“: 50%

“m/z tolerance“: 0.0055 m/z

“Retention time tolerance“: 0.1

“RT correction“: yes

Eine genaue Beschreibung der Algorithmen, die dem Programm zugrundeliegen, finden sich in der Dokumentation zu der Software¹.

Die Berechnung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses sowie der dazugehörigen p-Werte erfolgt mittels eines von Dr. Douglas Murray zur Verfügung gestellten R-Skriptes.

¹<http://mzmine.sourceforge.net/docs.shtml>

B Ergänzendes Material zu Kapitel 3

B.1 Ergänzendes Material zu Abschnitt 3.3

B.1.1 Verwendete Gleichungen

Details zum Modell dargestellt in Abbildung 3.1 (Seite 25), das verwendet wird, um Strategien zur optimalen Biomasseproduktion in Anwesenheit von toxischen Nebenprodukten zu untersuchen.

Die verwendeten Ratengleichungen sind dabei gegeben durch

$$v_1 = k_1 \cdot \left([R_x] - \frac{[R]}{K_1} \right) \quad (\text{B.1a})$$

$$v_2 = k_2 \cdot \left([R] - \frac{[A_1]}{K_2} \right) \quad (\text{B.1b})$$

$$v_3 = k_3 \cdot \left([A_1] - \frac{[A_2]}{K_3} \right) \quad (\text{B.1c})$$

$$v_4 = k_4 \cdot \left([A_2] - \frac{[A_3]}{K_4} \right) \quad (\text{B.1d})$$

$$v_5 = k_5 \cdot \left([A_3] - \frac{[C] \cdot [X]}{K_8} \right) \quad (\text{B.1e})$$

$$v_6 = k_6 \cdot \left([R] - \frac{[B_1]}{K_5} \right) \quad (\text{B.1f})$$

$$v_7 = k_7 \cdot \left([B_1] - \frac{[B_2]}{K_6} \right) \quad (\text{B.1g})$$

$$v_8 = k_8 \cdot \left([B_2] - \frac{[B_3]}{K_7} \right) \quad (\text{B.1h})$$

$$v_9 = k_9 \cdot \left([B_3] - \frac{[D] \cdot [Y]}{K_9} \right) \quad (\text{B.1i})$$

$$v_{10} = k_{10} \cdot [X] \cdot [B_2] \quad (\text{B.1j})$$

$$v_{11} = k_{11} \cdot [Y] \cdot [A_2] \quad (\text{B.1k})$$

$$v_{12} = k_{12} \cdot [X] \quad (\text{B.1l})$$

$$v_{13} = k_{13} \cdot [Y] \quad (\text{B.1m})$$

$$v_{14} = k_{14} \cdot [C] \cdot [D]. \quad (\text{B.1n})$$

Reaktionen 10 bis 14 sind irreversibel. Die Gleichgewichtskonstanten K_1 , K_4 und K_7 betragen 1, K_2 und K_5 sind 2, K_3 und K_6 sind 5 und K_8 und K_9 haben den Wert 500, da die Reaktionen v_5 und v_9 nur schwer umkehrbar sein sollen. Das dazugehörige Differentialgleichungssystem liest sich wie folgt:

$$\frac{d[R]}{dt} = v_1 - v_2 - v_6 \quad (\text{B.2a})$$

$$\frac{d[A_1]}{dt} = v_2 - v_3 \quad (\text{B.2b})$$

$$\frac{d[A_2]}{dt} = v_3 - v_4 - v_{11} \quad (\text{B.2c})$$

$$\frac{d[A_3]}{dt} = v_4 - v_5 \quad (\text{B.2d})$$

$$\frac{d[B_1]}{dt} = v_6 - v_7 \quad (\text{B.2e})$$

$$\frac{d[B_2]}{dt} = v_7 - v_8 - v_{10} \quad (\text{B.2f})$$

$$\frac{d[B_3]}{dt} = v_8 - v_9 \quad (\text{B.2g})$$

$$\frac{d[C]}{dt} = v_5 - v_{14} \quad (\text{B.2h})$$

$$\frac{d[D]}{dt} = v_9 - v_{14} \quad (\text{B.2i})$$

$$\frac{d[X]}{dt} = a \cdot v_5 - v_{10} - v_{12} \quad (\text{B.2j})$$

$$\frac{d[Y]}{dt} = b \cdot v_9 - v_{11} - v_{13} \quad (\text{B.2k})$$

$$\frac{d[BM]}{dt} = v_{14}. \quad (\text{B.2l})$$

B.1.2 *In-silico* Evolution - konkreter Ablauf

Für das hier untersuchte Problem läuft der Algorithmus wie folgt ab:

Zunächst wird eine Population von 100 Zellen erzeugt; jede einzelne Zelle wird dabei durch ein Differentialgleichungssystem repräsentiert, das im Abschnitt B.1.1 angegeben ist.

Die kinetischen Ratenkonstanten k_i (mit $i = 1, \dots, 14$) werden zufällig gewählt und sind durch eine metabolische Kapazität K beschränkt [35, 55], so dass

$$\sum_{i=1}^{14} \alpha_i k_i = K, \quad (\text{B.3})$$

wobei $K = 15$ gesetzt ist. Die Koeffizienten α_i stellen Wichtungsfaktoren dar, die die unterschiedlichen Molekularitäten der Reaktionen berücksichtigen, so dass die Ratenkonstanten als proportional zu den jeweiligen Enzymkonzentrationen angesehen

werden können. Nachfolgend sind alle α_i auf 1 gesetzt.

Zudem wird pro Zelle eine Regulationskonstante, K_{act} beziehungsweise K_{inh} , aus dem Intervall $(0, 10]$ bestimmt, die die Art der Regulation - Aktivierung oder Inhibition - festlegen, wobei der jeweilige Regulationsterm folgendermaßen definiert ist:

$$r_{act} = \frac{[X]^n}{[X]^n + K_{act}^n} \quad (\text{B.4a})$$

$$r_{inh} = \frac{K_{inh}^n}{[X]^n + K_{inh}^n}. \quad (\text{B.4b})$$

Der Hillkoeffizient n beträgt 10; $[X]$ bezeichnet die Konzentration eines Intermediaten. Pro Zelle kann genau eine Reaktion mittels eines solchen Regulationsterms modifiziert werden, was über einer Multiplikation der Rate mit dem Regulationsterm geschieht. Welche Reaktion modifiziert wird, unterliegt dem Zufall. Diese Regulationsterme nehmen Werte innerhalb des Intervalls $[0, 1]$ an und können somit Raten nicht erhöhen, sondern diese in Abhängigkeit einer Konzentration lediglich an- oder ausschalten.

Nun werden in jeder Generation die Zellen zunächst mutiert und zu der bestehenden Population hinzugefügt; die neue Populationsgröße beträgt damit $2N$. Die Mutation geht dabei derart vonstatten, dass zunächst eine Ratenkonstante k_i zufällig gewählt und deren Wert geändert wird, der dann k'_i beträgt: $k'_i = |k_i + \gamma \cdot \xi|$, mit $\gamma = 0.1$. ξ ist eine aus einer Gaußverteilung mit Mittelwert 0 und Standardabweichung 1 gezogenen Zufallszahl. Die Betragsbildung garantiert, dass die Ratenkonstanten stets positive Werte annehmen. Die Ratenkonstanten werden nun normiert, so dass sie Gleichung B.3 erfüllen, womit verhindert wird, dass die Ratenkonstanten unendlich groß werden können und der begrenzten Enzymkapazität der Zelle Rechnung getragen wird. Um eine triviale Lösung zu vermeiden, sind die Ratenkonstanten von v_{10} und v_{11} auf den Wert 2 festgesetzt und werden nicht evolviert, da die entsprechenden Flüsse sonst auf 0 gesetzt werden könnten, um dadurch eine Schädigung zu vermeiden. Die Regulationsterme K_{act} und K_{inh} (Gleichungen B.4) werden analog zu den Ratenkonstanten mutiert. Mit einer Wahrscheinlichkeit von $p = 0.1$ modifizieren sie in der nächsten Generation eine andere Rate, die zufällig gewählt wird, was eine gewisse Variabilität innerhalb der Population wahr. Für jede der $2N$ Zellen wird nun das entsprechende Differentialgleichungssystem gelöst und die produzierte Biomasse als Maß für die Fitness der Zelle verwendet. Die N Zellen mit der höchsten Biomasseproduktion werden selektiert und bilden damit die neue Elterngeneration. Dieser Prozess - abgesehen von der Initialisierung - wird für $G = 1000$ Generationen durchgeführt; die Ergebnisse werden auf Konvergenz überprüft. Die Simulationen finden in konstanter Umgebung statt, R_x ist auf den Wert 5 fixiert. Um zu testen, inwieweit die Ergebnisse von den Anfangsverteilungen der Parameter abhängen, werden 50 verschiedene Populationen evolviert.

B.1.3 Zeitreihen ohne Regulation

Wird dieses System mittels *in-silico* Evolution optimiert, erhält man eine oszillatorische Lösung, wenn das Etablieren von Regulationsstrukturen erlaubt ist. Wird das System evolviert, ohne dass die Zellen die Möglichkeit besitzen Regulationsstrukturen zu etablieren, konvergiert das System in einen stationären Zustand. Abbildung B.1 zeigt zu Abbildung 3.3 (Seite 29) ergänzende Zeitreihen einer dafür typischen Lösung sowie die Konvergenz der Durchschnittsfitness der Population.

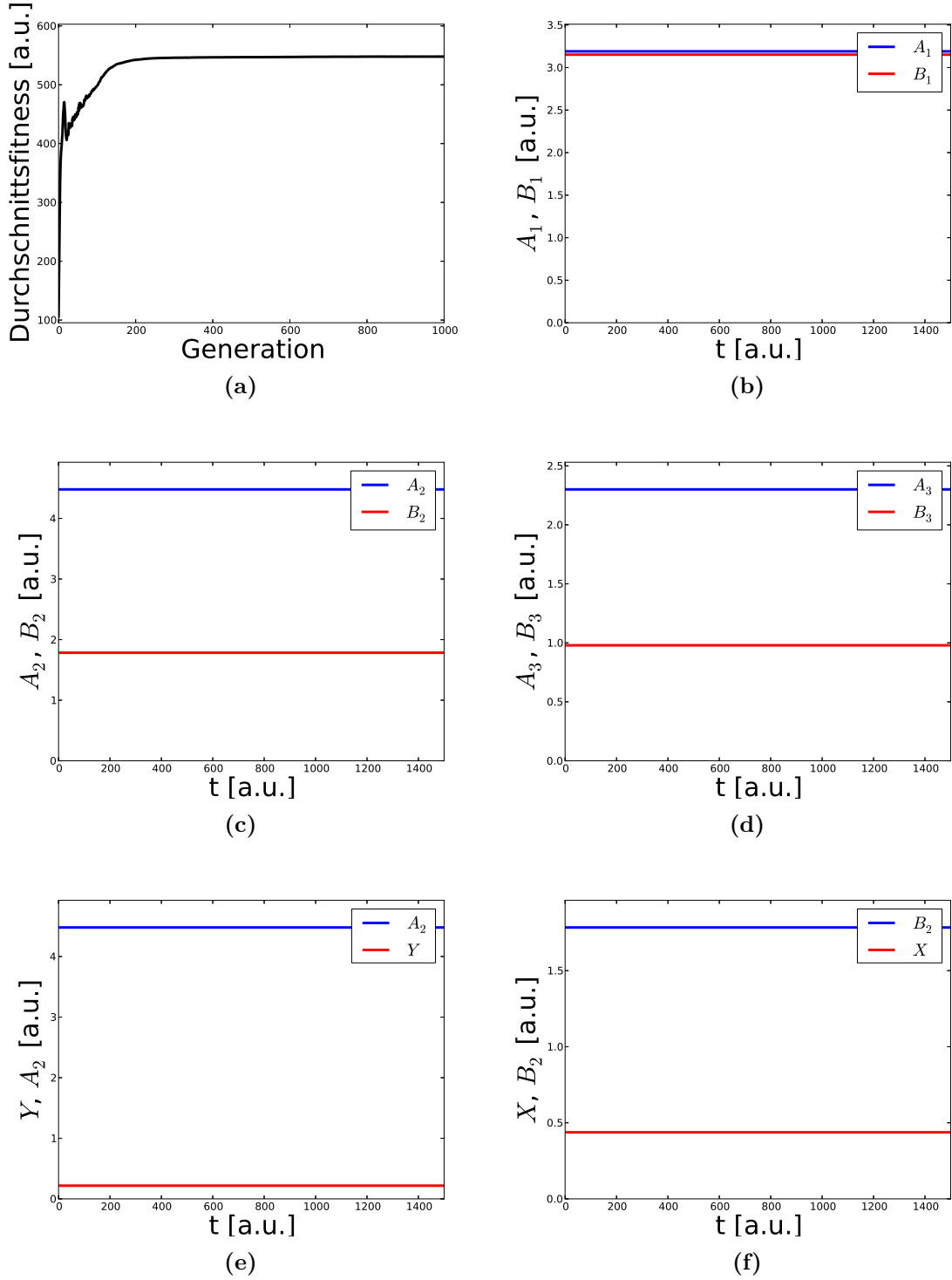


Abbildung B.1: Die evolvierten Lösungen für das Minimalsystem dargestellt in Abbildung 3.1, wobei die Zellen nicht die Möglichkeit haben Regulationsstrukturen zu etablieren. Optimiert wurde auf Biomasseproduktion. Als optimale Lösung erhält man einen stationären Zustand. Teilabbildung (a) zeigt die Konvergenz der Durchschnittsfitness der Population. Teilabbildungen (b) bis (d) zeigen die Zeitverläufe der Intermediate der jeweiligen Ketten. Teilabbildungen (e) und (f) zeigen die Zeitverläufe der toxischen Nebenprodukte, X und Y, und die Zeitverläufe der Metabolite, die durch selbige abgebaut werden können, A_2 bzw. B_2 .

B.2 Ergänzende Gleichungen zu Abschnitt 3.4.1

Details zum Modell dargestellt in Abbildung 3.5 (Seite 34), das verwendet wird, um Strategien zur optimalen Biomasseproduktion eines Systems, in dem Biosynthesewege gegenläufige Anforderungen an das Reaktionsmilieu aufweisen, zu untersuchen.

Die verwendeten Ratengleichungen sind dabei gegeben durch

$$v_1 = k_1 \cdot \left([R_x] - \frac{[R]}{K_1} \right) \quad (\text{B.5a})$$

$$v_2 = k_2 \cdot \left([R] \cdot [F_1] - \frac{[A_1] \cdot [F_2]}{K_2} \right) \quad (\text{B.5b})$$

$$v_3 = k_3 \cdot \left([A_1] - \frac{[A_2]}{K_3} \right) \quad (\text{B.5c})$$

$$v_4 = k_4 \cdot \left([A_2] \cdot [F_1] - \frac{[A_3] \cdot [F_2]}{K_4} \right) \quad (\text{B.5d})$$

$$v_5 = k_5 \cdot \left([A_3] - \frac{[C]}{K_8} \right) \quad (\text{B.5e})$$

$$v_6 = k_6 \cdot \left([R] \cdot [F_2] - \frac{[B_1] \cdot [F_1]}{K_5} \right) \quad (\text{B.5f})$$

$$v_7 = k_7 \cdot \left([B_1] - \frac{[B_2]}{K_6} \right) \quad (\text{B.5g})$$

$$v_8 = k_8 \cdot \left([B_2] \cdot [F_2] - \frac{[B_3] \cdot [F_1]}{K_7} \right) \quad (\text{B.5h})$$

$$v_9 = k_9 \cdot \left([B_3] - \frac{[D]}{K_9} \right) \quad (\text{B.5i})$$

$$v_{10} = k_{10} \cdot \frac{[F_1]^n}{K f_1^n + [F_1]^n} \quad (\text{B.5j})$$

$$v_{11} = k_{11} \cdot \frac{[F_2]^n}{K f_2^n + [F_2]^n} \quad (\text{B.5k})$$

$$v_{12} = k_{12} \cdot [C] \cdot [D]. \quad (\text{B.5l})$$

Die kinetischen Ratenkonstanten k_i werden - abgesehen von k_{10} und k_{11} , die jeweils 5 betragen - zufällig gewählt und sind durch eine metabolische Kapazität K beschränkt [35, 55], so dass

$$\sum_{i=1}^{12} \alpha_i k_i = K \quad (\text{B.6})$$

wobei $K = 20$ gesetzt ist. Die Koeffizienten α_i stellen Wichtungsfaktoren dar, die die unterschiedlichen Molekularitäten der Reaktionen berücksichtigen, so dass die Ratenkonstanten als proportional zu den jeweiligen Enzymkonzentrationen angesehen werden können. In sämtlichen Simulationen ist α_i auf 1 gesetzt.

R_x beträgt 10. Die Gleichgewichtskonstanten K_1 , K_4 und K_7 betragen 1, K_2 und K_5

B.2 Ergänzende Gleichungen zu Abschnitt 3.4.1

sind 2, K_3 und K_6 sind 5 und K_8 und K_9 haben den Wert 50. Der Hillkoeffizient n ist auf den Wert 10 festgesetzt. Die Konstanten Kf_1 und Kf_2 betragen jeweils $\frac{5}{3}$.

Das Differentialgleichungssystem sieht wie folgt aus:

$$\frac{d[R]}{dt} = v_1 - v_2 - v_6 \quad (\text{B.7a})$$

$$\frac{d[A_1]}{dt} = v_2 - v_3 \quad (\text{B.7b})$$

$$\frac{d[A_2]}{dt} = v_3 - v_4 \quad (\text{B.7c})$$

$$\frac{d[A_3]}{dt} = v_4 - v_5 \quad (\text{B.7d})$$

$$\frac{d[B_1]}{dt} = v_6 - v_7 \quad (\text{B.7e})$$

$$\frac{d[B_2]}{dt} = v_7 - v_8 \quad (\text{B.7f})$$

$$\frac{d[B_3]}{dt} = v_8 - v_9 \quad (\text{B.7g})$$

$$\frac{d[C]}{dt} = v_5 - v_{12} \quad (\text{B.7h})$$

$$\frac{d[D]}{dt} = v_9 - v_{12} \quad (\text{B.7i})$$

$$\frac{d[F_1]}{dt} = v_{11} - v_{10} \quad (\text{B.7j})$$

$$\frac{d[F_2]}{dt} = v_{10} - v_{11} \quad (\text{B.7k})$$

$$\frac{d[BM]}{dt} = v_{12}. \quad (\text{B.7l})$$

Wird dieses System evolviert, können zwei Regulationstrukturen (Gleichung B.4) pro Zelle verwendet werden.

B.3 Minimierung des Enzymbedarfs in Abschnitt 3.4.2

Das verwendete Modell umfasst neun Reaktionen, die mittels reversibler Michaelis-Menten-Kinetiken modelliert sind:

$$v_0 = [E_0] \cdot k_0 \cdot \frac{\frac{1}{K_{R_x}} \cdot \left(R_x - \frac{R}{K_0}\right)}{f_0} \quad (\text{B.8a})$$

$$v_1 = [E_1] \cdot k_1 \cdot \frac{\frac{1}{K_R} \cdot \left(R - \frac{A_1}{K_1}\right)}{f_1} \quad (\text{B.8b})$$

$$v_2 = [E_2] \cdot k_2 \cdot \frac{\frac{1}{K_{A_1} \cdot K_{F_1}} \cdot \left(A_1 \cdot F_1 - \frac{A_2 \cdot F_2}{K_2}\right)}{f_2} \quad (\text{B.8c})$$

$$v_3 = [E_3] \cdot k_3 \cdot \frac{\frac{1}{K_{A_2} \cdot K_{F_1}} \cdot \left(A_2 \cdot F_1 - \frac{C \cdot F_2}{K_3}\right)}{f_3} \quad (\text{B.8d})$$

$$v_4 = [E_4] \cdot k_4 \cdot \frac{\frac{1}{K_C} \cdot \left(C - \frac{C_x^0}{K_4}\right)}{f_4} \quad (\text{B.8e})$$

$$v_5 = [E_5] \cdot k_5 \cdot \frac{\frac{1}{K_R} \cdot \left(R - \frac{B_1}{K_5}\right)}{f_5} \quad (\text{B.8f})$$

$$v_6 = [E_6] \cdot k_6 \cdot \frac{\frac{1}{K_{B_1} \cdot K_{F_2}} \cdot \left(B_1 \cdot F_2 - \frac{B_2 \cdot F_1}{K_6}\right)}{f_6} \quad (\text{B.8g})$$

$$v_7 = [E_7] \cdot k_7 \cdot \frac{\frac{1}{K_{B_2} \cdot K_{F_2}} \cdot \left(B_2 \cdot F_2 - \frac{D \cdot F_1}{K_7}\right)}{f_7} \quad (\text{B.8h})$$

$$v_8 = [E_8] \cdot k_8 \cdot \frac{\frac{1}{K_D} \cdot \left(D - \frac{D_x^0}{K_8}\right)}{f_8}. \quad (\text{B.8i})$$

B.3 Minimierung des Enzymbedarfs in Abschnitt 3.4.2

Die Sättigungsterme f_i sind dabei wie folgt definiert:

$$f_0 = \left(1 + \frac{R_x}{KM_{R_{ext}}} + \frac{R}{KM_R}\right) \quad (\text{B.9a})$$

$$f_1 = \left(1 + \frac{R}{KM_R} + \frac{A_1}{KM_{A_1}}\right) \quad (\text{B.9b})$$

$$f_2 = \left(1 + \frac{A_1}{KM_{A_1}} + \frac{F_2}{KM_{F_2}}\right) \cdot \left(1 + \frac{A_2}{KM_{A_2}} + \frac{F_1}{KM_{F_1}}\right) \quad (\text{B.9c})$$

$$f_3 = \left(1 + \frac{A_2}{KM_{A_2}} + \frac{F_2}{KM_{F_2}}\right) \cdot \left(1 + \frac{C}{KM_C} + \frac{F_1}{KM_{F_1}}\right) \quad (\text{B.9d})$$

$$f_4 = \left(1 + \frac{C}{KM_C} + \frac{C_x}{KM_{C_{ext}}}\right) \quad (\text{B.9e})$$

$$f_5 = \left(1 + \frac{R}{KM_R} + \frac{B_1}{KM_{B_1}}\right) \quad (\text{B.9f})$$

$$f_6 = \left(1 + \frac{B_1}{KM_{B_1}} + \frac{F_1}{KM_{F_1}}\right) \cdot \left(1 + \frac{B_2}{KM_{B_2}} + \frac{F_2}{KM_{F_2}}\right) \quad (\text{B.9g})$$

$$f_7 = \left(1 + \frac{B_2}{KM_{B_2}} + \frac{F_1}{KM_{F_1}}\right) \cdot \left(1 + \frac{D}{KM_D} + \frac{F_2}{KM_{F_2}}\right) \quad (\text{B.9h})$$

$$f_8 = \left(1 + \frac{D}{KM_D} + \frac{D_x}{KM_{D_{ext}}}\right). \quad (\text{B.9i})$$

Formt man Gleichungen B.8 jeweils nach E_i um, so lässt sich damit folgendes Optimierungsproblem formulieren:

$$\sum_{i=0}^8 [E_i] \rightarrow \min, \quad (\text{B.10a})$$

mit der in Gleichungen B.11 bis B.13 abgeleiteten Nebenbedingung

$$A \cdot x < b. \quad (\text{B.10b})$$

A , x und b ergeben sich aus den thermodynamischen Beschränkungen, denen das System unterliegt und werden im Folgenden hergeleitet.

Damit sämtliche Raten B.8 positiv sind, müssen folgenden Ungleichungen erfüllt sein:

$$0 < R_x - \frac{R}{K_0} \quad (\text{B.11a})$$

$$0 < R - \frac{A_1}{K_1} \quad (\text{B.11b})$$

$$0 < A_1 \cdot F_1 - \frac{A_2 \cdot F_2}{K_2} \quad (\text{B.11c})$$

$$0 < A_2 \cdot F_1 - \frac{C \cdot F_2}{K_3} \quad (\text{B.11d})$$

$$0 < C - \frac{C_x}{K_4} \quad (\text{B.11e})$$

$$0 < R - \frac{B_1}{K_5} \quad (\text{B.11f})$$

$$0 < B_1 \cdot F_2 - \frac{B_2 \cdot F_1}{K_6} \quad (\text{B.11g})$$

$$0 < B_2 \cdot F_2 - \frac{D \cdot F_1}{K_7} \quad (\text{B.11h})$$

$$0 < D - \frac{D_x}{K_8}. \quad (\text{B.11i})$$

Logarithmiert man diese Terme, lesen sie sich wie folgt:

$$0 < \ln(R_x) - \ln(R) + \ln(K_0) \quad (\text{B.12a})$$

$$0 < \ln(R) - \ln(A_1) + \ln(K_1) \quad (\text{B.12b})$$

$$0 < \ln(A_1) + \ln(F_1) - \ln(A_2) - \ln(F_2) + \ln(K_2) \quad (\text{B.12c})$$

$$0 < \ln(A_2) + \ln(F_1) - \ln(C) - \ln(F_2) + \ln(K_3) \quad (\text{B.12d})$$

$$0 < \ln(C_x) - \ln(C) + \ln(K_4) \quad (\text{B.12e})$$

$$0 < \ln(R) - \ln(B_1) + \ln(K_5) \quad (\text{B.12f})$$

$$0 < \ln(B_1) + \ln(F_2) - \ln(B_2) - \ln(F_1) + \ln(K_6) \quad (\text{B.12g})$$

$$0 < \ln(B_2) + \ln(F_2) - \ln(D) - \ln(F_1) + \ln(K_7) \quad (\text{B.12h})$$

$$0 < \ln(D_x) - \ln(D) + \ln(K_8). \quad (\text{B.12i})$$

B.3 Minimierung des Enzymbedarfs in Abschnitt 3.4.2

Formt man diese Terme derart um, dass die Variablen auf der linken und die Parameter auf der rechten Seite stehen, ergeben sich die folgenden Beziehungen:

$$\ln(R) < \ln(R_x^0) + \ln(K_0) \quad (\text{B.13a})$$

$$-\ln(R) + \ln(A_1) < \ln(K_1) \quad (\text{B.13b})$$

$$-\ln(A_1) - \ln(F_1) + \ln(A_2) + \ln(F_2) < \ln(K_2) \quad (\text{B.13c})$$

$$-\ln(A_2) - \ln(F_1) + \ln(C) + \ln(F_2) < \ln(K_3) \quad (\text{B.13d})$$

$$-\ln(C) < -\ln(C_x) + \ln(K_4) \quad (\text{B.13e})$$

$$-\ln(R) + \ln(B_1) < \ln(K_5) \quad (\text{B.13f})$$

$$-\ln(B_1) - \ln(F_2) + \ln(B_2) + \ln(F_1) < \ln(K_6) \quad (\text{B.13g})$$

$$-\ln(B_2) - \ln(F_2) + \ln(D) + \ln(F_1) < \ln(K_7) \quad (\text{B.13h})$$

$$-\ln(D) < -\ln(D_x) + \ln(K_8). \quad (\text{B.13i})$$

Somit lassen sich A , x und b nun folgendermaßen definieren:

$$A = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ -1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 1 \\ 0 & 0 & -1 & 1 & 0 & 0 & 0 & -1 & 1 \\ 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ -1 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 1 & 0 & 1 & -1 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 1 & 1 & -1 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 \end{pmatrix}$$

$$x = \begin{pmatrix} \ln(R) \\ \ln(A_1) \\ \ln(A_2) \\ \ln(C) \\ \ln(B_1) \\ \ln(B_2) \\ \ln(D) \\ \ln(F_1) \\ \ln(F_2) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} R_l \\ A_{1l} \\ A_{2l} \\ C_l \\ B_{1l} \\ B_{2l} \\ D_l \\ F_{1l} \\ F_{2l} \end{pmatrix}$$

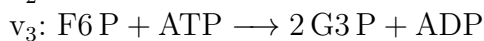
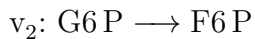
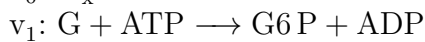
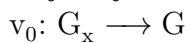
$$b = \begin{pmatrix} \ln(R_x^0) + \ln(K_0) \\ \ln(K_1) \\ \ln(K_2) \\ \ln(K_3) \\ -\ln(C_x^0) + \ln(K_4) \\ \ln(K_5) \\ \ln(K_6) \\ \ln(K_7) \\ -\ln(D_x^0) + \ln(K_8) \end{pmatrix}$$

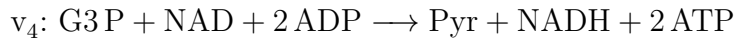
Die Optimierung von Gleichung B.10 erfolgt dabei mit der in Matlab vorimplementierten Methode “fmincon” mit dem Optimierungsalgorithmus “interior-point” und Standardeinstellungen.

B.4 Gleichungen für Minimalmodell

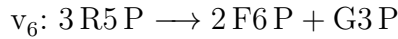
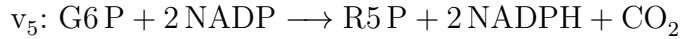
Gleichungen zu dem Modell, das in Abbildung 3.10 dargestellt ist.

Glykolyse:

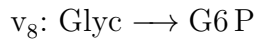
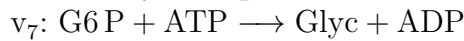




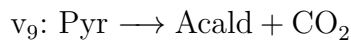
Pentose-Phosphat-Weg:



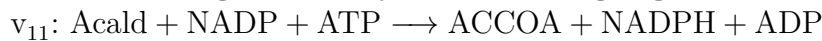
Kohlenhydratspeicher:



Fermentation:



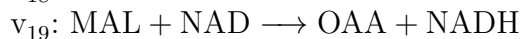
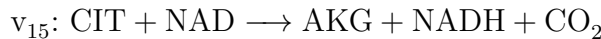
Alternativweg der Acetyl-CoA-Erzeugung:



Anaplerotische Reaktion:



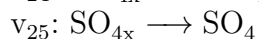
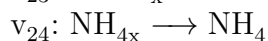
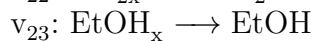
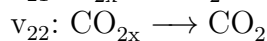
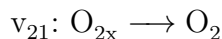
Citratzyklus:



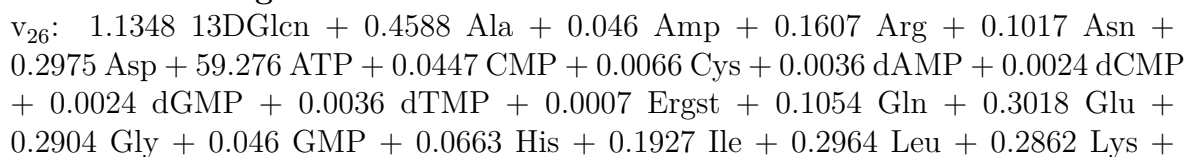
Respiration:

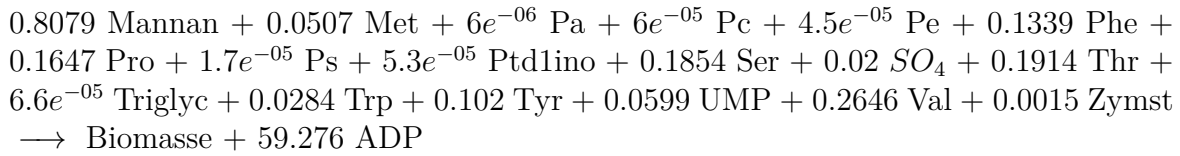


Austauschreaktionen:



Biomassebildung:

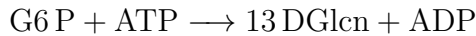




Die Biomassefunktion, v_{26} , ist dabei dem in der Arbeit verwendeten Modell entnommen; Erweiterungen des Modells sind leicht denkbar. So könnte es dahingehend modifiziert werden, dass Respiration mit der Produktion von ROS einhergeht, die bestimmte Biomassekomponenten abbauen. Die Nettogleichungen für die einzelnen Biomassekomponenten sind nachfolgend angegeben; diese wurden über FBA bestimmt, wobei alle im Modell vorhandenen Metabolite benutzt werden konnten, um ein Mol der entsprechenden Biomassekomponente zu bilden, wobei dies mit möglichst wenig enzymatischen Schritten passieren soll.

Nach Wahl der geeigneten Kinetiken kann dieses System evolviert werden, wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben. Die Glucoseaufnahmerate könnte dabei zunächst konstant gehalten werden, um zu testen, ob man bei Optimierung auf Biomasse sich selbst erhaltende Oszillationen erhält. Auch lassen sich die Austauschraten für Glucose, Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid vorgeben und die Produktion der Biomasse über einen Zyklus hinweg maximieren [30], was ebenfalls Rückschlüsse über die optimalen Produktionszeiträume einzelner Biomassekomponenten erlaubt.

13DGlcN:



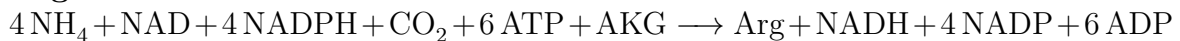
Ala:



AMP:



Arg:



Asn:



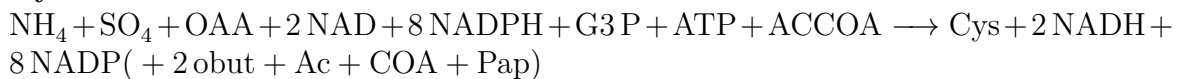
Asp:



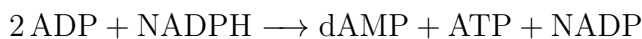
CMP:



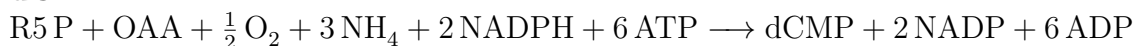
Cys:



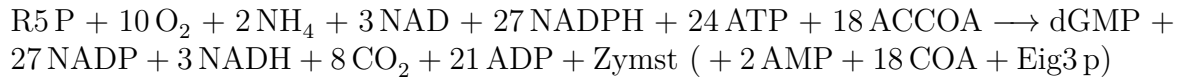
dAMP:



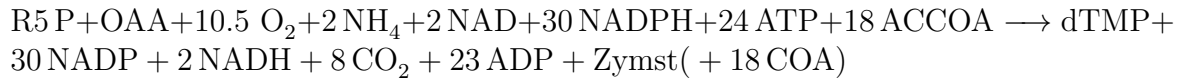
dCMP:



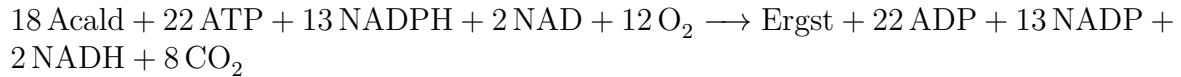
dGMP:



dTMP:



Ergst:



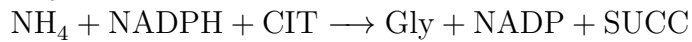
Gln:



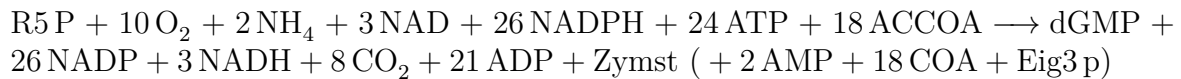
Glu:



Gly:



GMP:



His:



Ile:



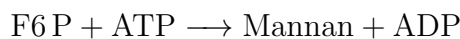
Leu:



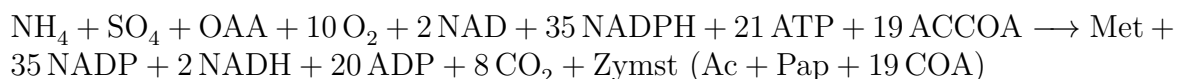
Lys:



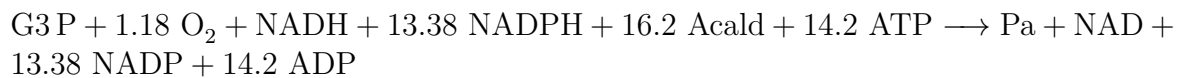
Mannan:



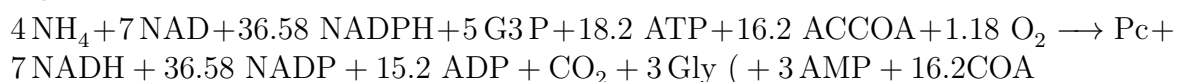
Met:



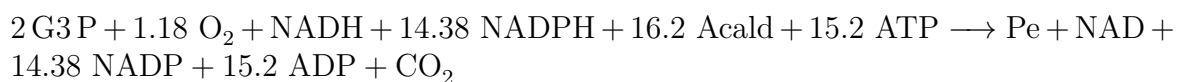
Pa:



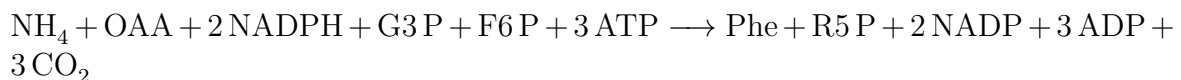
Pc:



Pe:



Phe:

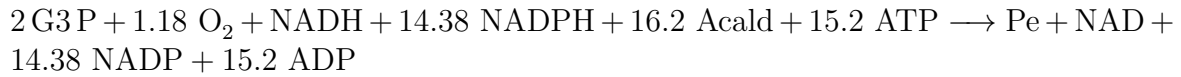


B Ergänzendes Material zu Kapitel 3

Pro:



Ps:



Ptlino:



Ser:



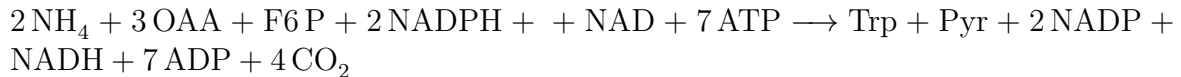
Thr:



Triglyc:



Trp:



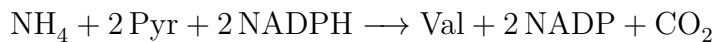
Tyr:



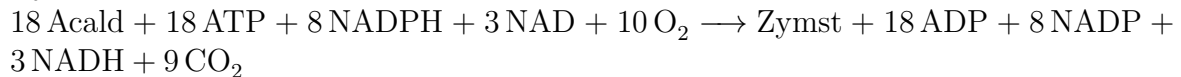
UMP:



Val:



Zymst:



C Ergänzendes Material zu Kapitel 4

Produktionsraten weiterer Biomassekomponenten, darunter Aminosäuren (Abbildung C.1), Nukleotide (Abbildung C.2) und Lipide (Abbildung C.3). Letztere können sets auch zu einem zu einem weiteren Zeitpunkt mit hoher Rate produziert werden, im Zeitpunkt acht. Dies erklärt sich dadurch, dass Lipide einen hohen Bedarf an *NADPH* haben (Tabelle 4.2); Zeitpunkt acht ist derjenige Zeitpunkt, zu dem auch *NADPH* seine höchste Bildungsrate aufweist (Abbildung 4.15).

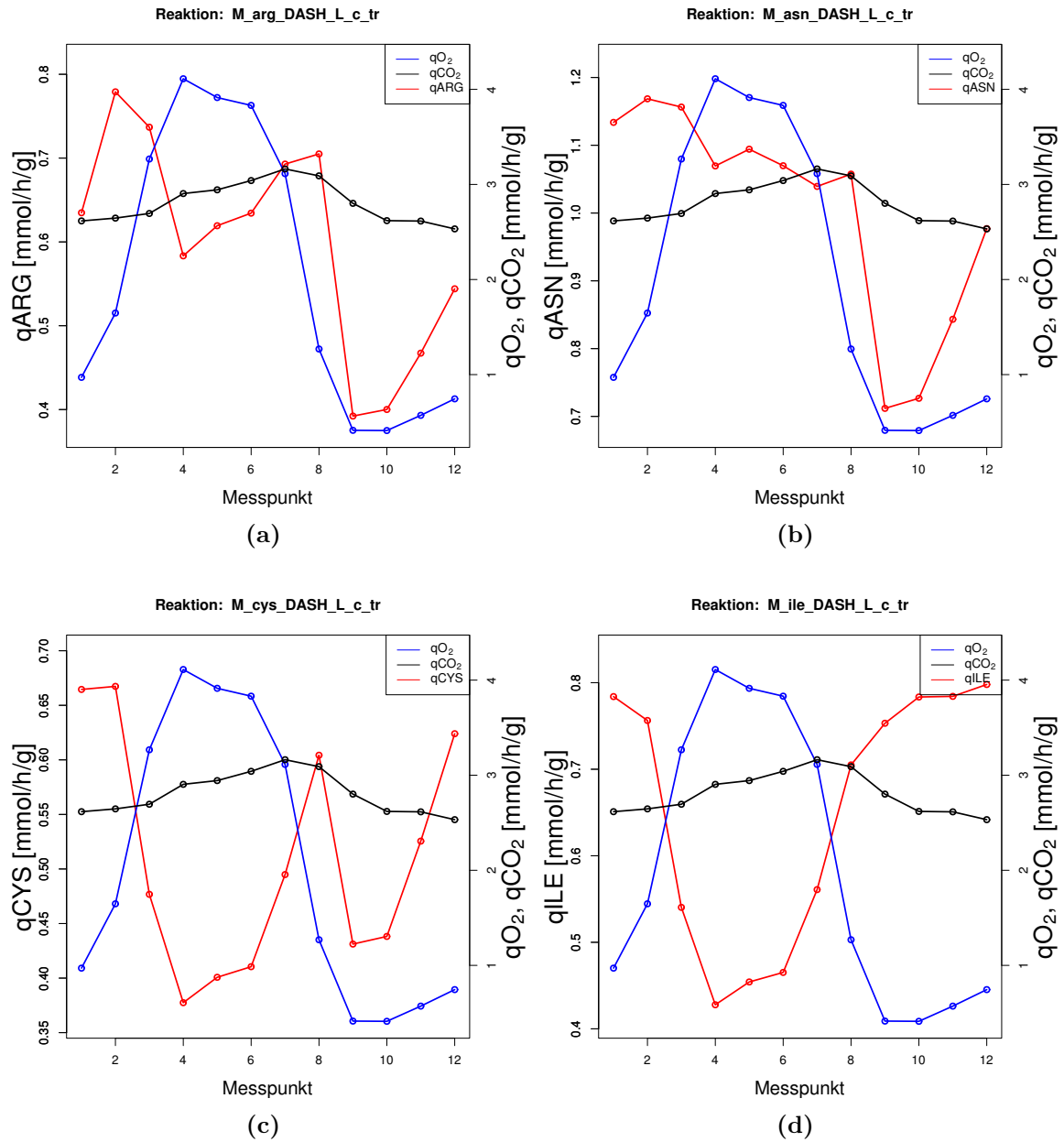


Abbildung C.1: Die optimalen Produktionsraten von Arginin, Asparagin, Cystein und Isoleucin in Abhängigkeit der Austauschraten für Glucose, Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid.

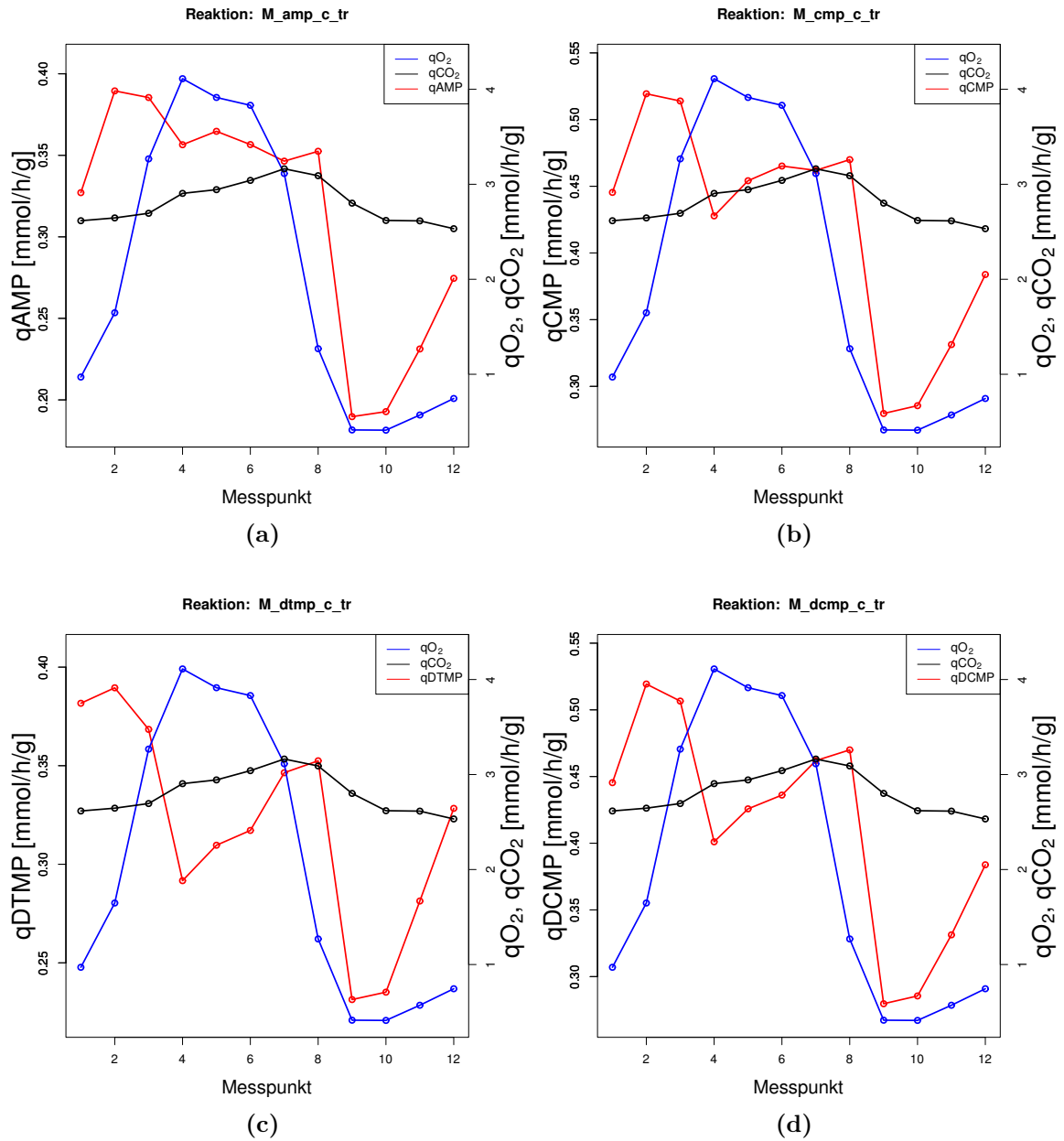


Abbildung C.2: Die optimalen Produktionsraten von AMP, CMP, dTMP und dCMP in Abhängigkeit der Austauschraten für Glucose, Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid.

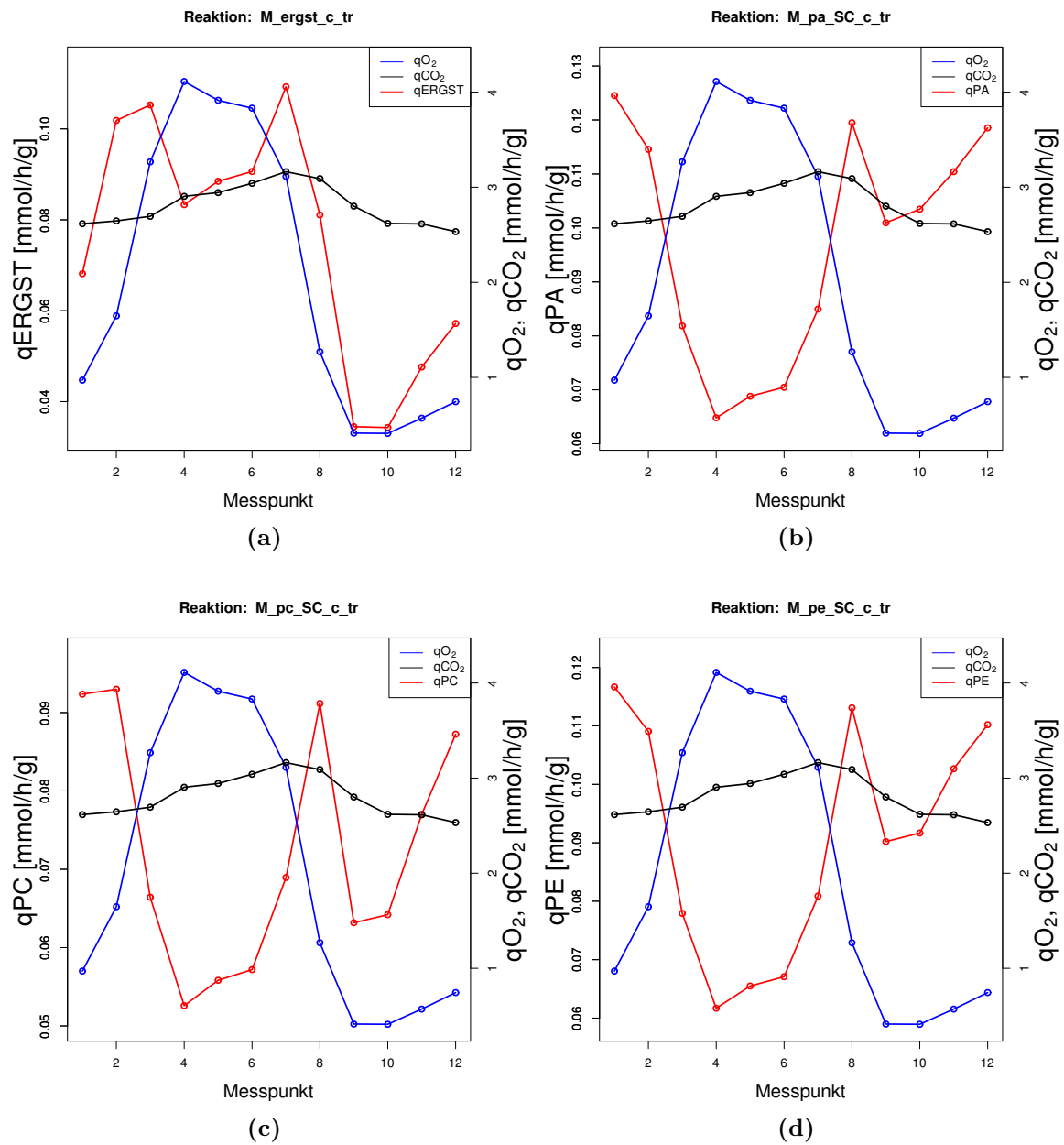


Abbildung C.3: Die optimalen Produktionsraten von AMP, CMP, dTMP und dCMP in Abhängigkeit der Austauschraten für Glucose, Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid.

Literaturverzeichnis

- [1] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. 2008. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science.
- [2] Amariei, Cornelia, Machne, Rainer, Sasidharan, Kalesh, Gottstein, Willi, Tomita, Masaru, Soga, Tomoyoshi, Lloyd, David, & Murray, Douglas B. 2013. The dynamics of cellular energetics during continuous yeast culture. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, **2013**, 2708–2711.
- [3] Beg, Q. K., Vazquez, A., Ernst, J., de Menezes, M. A., Bar-Joseph, Z., Barabási, A-L., & Oltvai, Z. N. 2007. Intracellular crowding defines the mode and sequence of substrate uptake by *Escherichia coli* and constrains its metabolic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**(31), 12663–12668.
- [4] Brauer, Matthew J., Huttenhower, Curtis, Airoidi, Edoardo M., Rosenstein, Rachel, Matese, John C., Gresham, David, Boer, Viktor M., Troyanskaya, Olga G., & Botstein, David. 2008. Coordination of growth rate, cell cycle, stress response, and metabolic activity in yeast. *Mol Biol Cell*, **19**(1), 352–367.
- [5] Buchakjian, Marisa R., & Kornbluth, Sally. 2010. The engine driving the ship: metabolic steering of cell proliferation and death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **11**(10), 715–727.
- [6] Cai, Ling, & Tu, Benjamin P. 2012. Driving the cell cycle through metabolism. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **28**, 59–87.
- [7] Chance, B., Hess, B., & Betz, A. 1964a. DPNH oscillations in a cell-free extract of *S. carlsbergensis*. *Biochem Biophys Res Commun*, **16**(2), 182–187.
- [8] Chance, B., B., Estabrook, R. W., & Gosh, A. 1964b. Damped sinusoidal oscillations of cytoplasmic reduced pyridine nucleotide in yeast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **51**(Jun), 1244–1251.
- [9] Chen, Zheng, Odstreil, Elizabeth A., Tu, Benjamin P., & McKnight, Steven L. 2007. Restriction of DNA replication to the reductive phase of the metabolic cycle protects genome integrity. *Science*, **316**(5833), 1916–1919.
- [10] Cho, R. J., Campbell, M. J., Winzeler, E. A., Steinmetz, L., Conway, A., Wodicka, L., Wolfsberg, T. G., Gabrielian, A. E., Landsman, D., Lockhart, D. J., & Davis, R. W. 1998. A genome-wide transcriptional analysis of the mitotic cell cycle. *Mol Cell*, **2**(1), 65–73.

LITERATURVERZEICHNIS

- [11] Covert, Markus W., Xiao, Nan, Chen, Tiffany J., & Karr, Jonathan R. 2008. Integrating metabolic, transcriptional regulatory and signal transduction models in *Escherichia coli*. *Bioinformatics*, **24**(18), 2044–2050.
- [12] De Deken, R. H. 1966. The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *J Gen Microbiol*, **44**(2), 149–156.
- [13] Dickson, Robert C. 2010. Roles for sphingolipids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Adv Exp Med Biol*, **688**, 217–231.
- [14] Doran, Pauline M. 1995. *Bioprocess Engineering Principles*. Academic Press.
- [15] Dowhan, W. 1997. Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids? *Annu Rev Biochem*, **66**, 199–232.
- [16] Duarte, Natalie C., Herrgard, Markus J., & Palsson, Bernhard. 2004. Reconstruction and validation of *Saccharomyces cerevisiae* iND750, a fully compartmentalized genome-scale metabolic model. *Genome Res*, **14**(7), 1298–1309.
- [17] Duyens, L. N., & Ames, J. 1957. Fluorescence spectrophotometry of reduced phosphopyridine nucleotide in intact cells in the near-ultraviolet and visible region. *Biochim Biophys Acta*, **24**(1), 19–26.
- [18] Ebenhöf, O., & Heinrich, R. 2001. Evolutionary optimization of metabolic pathways. Theoretical reconstruction of the stoichiometry of ATP and NADH producing systems. *Bull Math Biol*, **63**(1), 21–55.
- [19] Edgar, Rachel S., Green, Edward W., Zhao, Yuwei, van Ooijen, Gerben, Olmedo, Maria, Qin, Ximing, Xu, Yao, Pan, Min, Valekunja, Utham K., Feeney, Kevin A., Maywood, Elizabeth S., Hastings, Michael H., Baliga, Nitin S., Merrow, Martha, Millar, Andrew J., Johnson, Carl H., Kyriacou, Charalambos P., O’Neill, John S., & Reddy, Akhilesh B. 2012. Peroxiredoxins are conserved markers of circadian rhythms. *Nature*, **485**(7399), 459–464.
- [20] Fajas, Lluís. 2013. Re-thinking cell cycle regulators: the cross-talk with metabolism. *Front Oncol*, **3**, 4.
- [21] Finn, R. K. 1954. Accounting for periodicities in biology. *The Bulletin of Mathematical Biophysics*, **16**(2), 181–182.
- [22] Finn, R. K., & Wilson, R. E. 1954. Fermentation Process Control, Population Dynamics of a Continuous Propagator for Microorganisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2**(2), 66–69.
- [23] Flamholz, Avi, Noor, Elad, Bar-Even, Arren, Liebermeister, Wolfram, & Milo, Ron. 2013. Glycolytic strategy as a tradeoff between energy yield and protein cost. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**(24), 10039–10044.

- [24] Fong, Stephen S., & Palsson, Bernhard. 2004. Metabolic gene-deletion strains of *Escherichia coli* evolve to computationally predicted growth phenotypes. *Nat Genet*, **36**(10), 1056–1058.
- [25] Frenkel, R. 1966. Reduced diphosphopyridine nucleotide oscillations in cell-free extracts from beef heart. *Arch Biochem Biophys*, **115**(1), 112–121.
- [26] Futcher, Bruce. 2006. Metabolic cycle, cell cycle, and the finishing kick to Start. *Genome Biol*, **7**(4), 107.
- [27] Gehring, Walter, & Rosbash, Michael. 2003. The coevolution of blue-light photo-reception and circadian rhythms. *J Mol Evol*, **57 Suppl 1**, S286–S289.
- [28] Goldbeter, A. 1995. A model for circadian oscillations in the *Drosophila* period protein (PER). *Proc Biol Sci*, **261**(1362), 319–324.
- [29] Goodwin, B. C. 1965. Oscillatory behavior in enzymatic control processes. *Adv Enzyme Regul*, **3**, 425–438.
- [30] Gottstein, Willi, Müller, Stefan, Herzel, Hanspeter, & Steuer, Ralf. 2014. Elucidating the adaptation and temporal coordination of metabolic pathways using in-silico evolution. *Biosystems*, **117**(Mar), 68–76.
- [31] Griffith, J. S. 1968. Mathematics of cellular control processes. I. Negative feedback to one gene. *J Theor Biol*, **20**(2), 202–208.
- [32] Hannich, J Thomas, Umebayashi, Kyohei, & Riezman, Howard. 2011. Distribution and functions of sterols and sphingolipids. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **3**(5).
- [33] Hans, Michael A., Heinzle, Elmar, & Wittmann, Christoph. 2003. Free intracellular amino acid pools during autonomous oscillations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng*, **82**(2), 143–151.
- [34] Hartwell, L. H., & Weinert, T. A. 1989. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*, **246**(4930), 629–634.
- [35] Heinrich, Reinhart, & Schuster, Stefan. 1996. *The Regulation of Cellular Systems*. Springer.
- [36] Heinzle, E., Dunn, I. J., Furukawa, K., & Tanner, R. D. 1983. Modelling of sustained oscillations observed in continuous culture of *Saccharomyces cerevisiae*. *Pages 57–65 of: Halme, A. (ed), Modelling and control of biotechnical processes*. Helsinki, Finland: Pergamon Press, for International Federation of Automatic Control.
- [37] Hess, B., Brand, K., & Pye, K. 1966. Continuous oscillations in a cell-free extract of *S. carlsbergensis*. *Biochem Biophys Res Commun*, **23**(1), 102–108.
- [38] Higgins, Joseph. 1967. The Theory of Oscillating Reactions - Kinetics Symposium. *Industrial & Engineering Chemistry*, **59**(5), 18–62.

LITERATURVERZEICHNIS

- [39] Hoppe, Andreas, Hoffmann, Sabrina, Gerasch, Andreas, Gille, Christoph, & Holzhütter, Hermann-Georg. 2011. FASIMU: flexible software for flux-balance computation series in large metabolic networks. *BMC Bioinformatics*, **12**, 28.
- [40] Ibarra, Rafael U., Edwards, Jeremy S., & Palsson, Bernhard O. 2002. Escherichia coli K-12 undergoes adaptive evolution to achieve in silico predicted optimal growth. *Nature*, **420**(6912), 186–189.
- [41] Inoue, S., Honda, K., & Komoda, Y. 1995. Sleep as neuronal detoxification and restitution. *Behav Brain Res*, **69**(1-2), 91–96.
- [42] Johnson, D. G., & Walker, C. L. 1999. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **39**, 295–312.
- [43] Jol, Stefan J., Kümmel, Anne, Terzer, Marco, Stelling, Jörg, & Heinemann, Matthias. 2012. System-level insights into yeast metabolism by thermodynamic analysis of elementary flux modes. *PLoS Comput Biol*, **8**(3), e1002415.
- [44] Jorgensen, Paul, & Tyers, Mike. 2004. How cells coordinate growth and division. *Curr Biol*, **14**(23), R1014–R1027.
- [45] Jorgensen, Paul, Nishikawa, Joy L., Breitkreutz, Bobby-Joe, & Tyers, Mike. 2002. Systematic identification of pathways that couple cell growth and division in yeast. *Science*, **297**(5580), 395–400.
- [46] Jorgensen, Paul, Rupes, Ivan, Sharom, Jeffrey R., Schnepfer, Lisa, Broach, James R., & Tyers, Mike. 2004. A dynamic transcriptional network communicates growth potential to ribosome synthesis and critical cell size. *Genes Dev*, **18**(20), 2491–2505.
- [47] Kamiya, Hiroyuki. 2003. Mutagenic potentials of damaged nucleic acids produced by reactive oxygen/nitrogen species: approaches using synthetic oligonucleotides and nucleotides: survey and summary. *Nucleic Acids Res*, **31**(2), 517–531.
- [48] Kashtan, N., & Alon, U. 2005. Spontaneous evolution of modularity and network motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**(39), 13773–13778.
- [49] Kashtan, N., Parter, M., Dekel, E., Mayo, A. E., & Alon, U. 2009. Extinctions in heterogeneous environments and the evolution of modularity. *Evolution*, **63**(8), 1964–1975.
- [50] Kaspar von Meyenburg, H. 1969. Energetics of the budding cycle of *Saccharomyces cerevisiae* during glucose limited aerobic growth. *Arch Mikrobiol*, **66**(4), 289–303.
- [51] Keulers, M., Suzuki, T., Satroutdinov, A. D., & Kuriyama, H. 1996a. Autonomous metabolic oscillation in continuous culture of *Saccharomyces cerevisiae* grown on ethanol. *FEMS Microbiol Lett*, **142**(2-3), 253–258.

- [52] Keulers, M., Satroutdinov, A. D., Suzuki, T., & Kuriyama, H. 1996b. Synchronization affector of autonomous short-period-sustained oscillation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **12**(7), 673–682.
- [53] Klapa, Maria I., Aon, Juan-Carlos, & Stephanopoulos, Gregory. 2003. Systematic quantification of complex metabolic flux networks using stable isotopes and mass spectrometry. *Eur J Biochem*, **270**(17), 3525–3542.
- [54] Klevecz, Robert R., Bolen, James, Forrest, Gerald, & Murray, Douglas B. 2004. A genomewide oscillation in transcription gates DNA replication and cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**(5), 1200–1205.
- [55] Klipp, E., & Heinrich, R. 1999. Competition for enzymes in metabolic pathways: implications for optimal distributions of enzyme concentrations and for the distribution of flux control. *Biosystems*, **54**(1-2), 1–14.
- [56] Klipp, E., Herwig, R., Kowald, A., Wierling, C., & Lehrach, H. 2005. *Systems Biology in Practice*. Wiley-Blackwell.
- [57] Küenzi, M. T., & Fiechter, A. 1969. Changes in carbohydrate composition and trehalase-activity during the budding cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Mikrobiol*, **64**(4), 396–407.
- [58] Kwak, Wie Jong, Kwon, Gi Seok, Jin, Ingyol, Kuriyama, Hiroshi, & Sohn, Ho Yong. 2003. Involvement of oxidative stress in the regulation of H(2)S production during ultradian metabolic oscillation of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett*, **219**(1), 99–104.
- [59] Lakshmanan, Meiyappan, Koh, Geoffrey, Chung, Bevan K S., & Lee, Dong-Yup. 2014. Software applications for flux balance analysis. *Brief Bioinform*, **15**(1), 108–122.
- [60] Lee, Jong Min, Min Lee, Jong, Gianchandani, Erwin P., Eddy, James A., & Papin, Jason A. 2008. Dynamic analysis of integrated signaling, metabolic, and regulatory networks. *PLoS Comput Biol*, **4**(5), e1000086.
- [61] Li, A., & Blow, J. J. 2001. The origin of CDK regulation. *Nat Cell Biol*, **3**(8), E182–E184.
- [62] Llaneras, Francisco, & Picó, Jesús. 2007. A procedure for the estimation over time of metabolic fluxes in scenarios where measurements are uncertain and/or insufficient. *BMC Bioinformatics*, **8**, 421.
- [63] Lloyd, David, & Murray, Douglas B. 2006. The temporal architecture of eukaryotic growth. *FEBS Lett*, **580**(12), 2830–2835.
- [64] Lotka, A. J. 1920. Analytical Note on Certain Rhythmic Relations in Organic Systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **6**(7), 410–415.

LITERATURVERZEICHNIS

- [65] Lowdon, M., & Vitols, E. 1973. Ribonucleotide reductase activity during the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys*, **158**(1), 177–184.
- [66] Lunt, Sophia Y., & Vander Heiden, Matthew G. 2011. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **27**, 441–464.
- [67] Machné, Rainer, & Murray, Douglas B. 2012. The yin and yang of yeast transcription: elements of a global feedback system between metabolism and chromatin. *PLoS One*, **7**(6), e37906.
- [68] Mahadevan, Radhakrishnan, Edwards, Jeremy S., & Doyle, 3rd, Francis J. 2002. Dynamic flux balance analysis of diauxic growth in *Escherichia coli*. *Biophys J*, **83**(3), 1331–1340.
- [69] Marx, A., de Graaf, A. A., Wiechert, W., Eggeling, L., & Sahm, H. 1996. Determination of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* by nuclear magnetic resonance spectroscopy combined with metabolite balancing. *Biotechnol Bioeng*, **49**(2), 111–129.
- [70] Michelucci, Alessandro, Cordes, Thekla, Ghelfi, Jenny, Pailot, Arnaud, Reiling, Norbert, Goldmann, Oliver, Binz, Tina, Wegner, André, Tallam, Aravind, Rausell, Antonio, Buttini, Manuel, Linster, Carole L., Medina, Eva, Balling, Rudi, & Hiller, Karsten. 2013. Immune-responsive gene 1 protein links metabolism to immunity by catalyzing itaconic acid production. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**(19), 7820–7825.
- [71] Mignot, Emmanuel. 2008. Why we sleep: the temporal organization of recovery. *PLoS Biol*, **6**(4), e106.
- [72] Millineaux, Philip M., Gallon, John R., & Chaplin, Alan E. 1981. Acetylene reduction (nitrogen fixation) by cyanobacteria grown under alternating light-dark cycles. *FEMS Microbiology Letters*, **10**(3), 245–247.
- [73] Mitsui, A., Kumazawa, S., Takahashi, A., Ikemoto, H., Cao, S., & Arai, T. 1986. Strategy by which nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria grow photoautotrophically. *Nature*, **323**(6090), 720–722.
- [74] Mochan, E., & Pye, E. K. 1973. Respiratory oscillations in adapting yeast cultures. *Nat New Biol*, **242**(119), 177–179.
- [75] Monod, J. 1950. La technique de culture continue. Théorie et applications. *Annales de l'Institut Pasteur*, **79**, 390–401.
- [76] Müller, Dirk, Exler, Simone, Aguilera-Vázquez, Luciano, Guerrero-Martín, Ester, & Reuss, Matthias. 2003. Cyclic AMP mediates the cell cycle dynamics of energy metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **20**(4), 351–367.
- [77] Murray, Douglas B., Beckmann, Manfred, & Kitano, Hiroaki. 2007. Regulation of yeast oscillatory dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**(7), 2241–2246.

- [78] Murray, Douglas B., Haynes, Ken, & Tomita, Masaru. 2011. Redox regulation in respiring *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, **1810**(10), 945–958.
- [79] Müller, Stefan, Murray, Douglas B., & Machne, Rainer. 2012. A new dynamic model for highly efficient mass transfer in aerated bioreactors and consequences for kLa identification. *Biotechnol Bioeng*, **109**(12), 2997–3006.
- [80] Neef, Daniel W., & Kladde, Michael P. 2003. Polyphosphate loss promotes SNF/SWI- and Gcn5-dependent mitotic induction of PHO5. *Mol Cell Biol*, **23**(11), 3788–3797.
- [81] Novak, Béla, & Tyson, John J. 2008. Design principles of biochemical oscillators. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**(12), 981–991.
- [82] Novick, A., & Szilard, L. 1950. Description of the chemostat. *Science*, **112**(2920), 715–716.
- [83] Nurse, P. 2000. A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell*, **100**(1), 71–78.
- [84] Orth, Jeffrey D., Thiele, Ines, & Palsson, Bernhard. 2010. What is flux balance analysis? *Nat Biotechnol*, **28**(3), 245–248.
- [85] Oura, E., Haarasilta, S., & Londesborough, J. 1980. Carbon Dioxide Fixation by Baker’s Yeast in a Variety of Growth Conditions. *Microbiology*, **118**(1), 51–58.
- [86] Pfeiffer, T., Schuster, S., & Bonhoeffer, S. 2001. Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. *Science*, **292**(5516), 504–507.
- [87] Pluskal, Tomas, Castillo, Sandra, Villar-Briones, Alejandro, & Oresic, Matej. 2010. MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics*, **11**(1), 395.
- [88] Pronk, J. T., Yde Steensma, H., & Van Dijken, J. P. 1996. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **12**(16), 1607–1633.
- [89] Pye, K., & Chance, B. 1966. Sustained sinusoidal oscillations of reduced pyridine nucleotide in a cell-free extract of *Saccharomyces carlsbergensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **55**(4), 888–894.
- [90] Reed, Jennifer L., & Palsson, Bernhard. 2004. Genome-scale in silico models of *E. coli* have multiple equivalent phenotypic states: assessment of correlated reaction subsets that comprise network states. *Genome Res*, **14**(9), 1797–1805.
- [91] Robertson, James Brian, Davis, Chris R., & Johnson, Carl Hirschie. 2013. Visible light alters yeast metabolic rhythms by inhibiting respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Dec.

LITERATURVERZEICHNIS

- [92] Rudra, Dipayan, & Warner, Jonathan R. 2004. What better measure than ribosome synthesis? *Genes Dev*, **18**(20), 2431–2436.
- [93] Ruoff, P., Vinsjevnik, M., Monnerjahn, C., & Rensing, L. 1999. The Goodwin oscillator: on the importance of degradation reactions in the circadian clock. *J Biol Rhythms*, **14**(6), 469–479.
- [94] Rustici, Gabriella, Mata, Juan, Kivinen, Katja, Lió, Pietro, Penkett, Christopher J., Burns, Gavin, Hayles, Jacqueline, Brazma, Alvis, Nurse, Paul, & Bähler, Jürg. 2004. Periodic gene expression program of the fission yeast cell cycle. *Nat Genet*, **36**(8), 809–817.
- [95] Sakai, Akiko, Nakanishi, Mari, Yoshiyama, Kaoru, & Maki, Hisaji. 2006. Impact of reactive oxygen species on spontaneous mutagenesis in *Escherichia coli*. *Genes Cells*, **11**(7), 767–778.
- [96] Sasidharan, Kalesh, Soga, Tomoyoshi, Tomita, Masaru, & Murray, Douglas B. 2012. A yeast metabolite extraction protocol optimised for time-series analyses. *PLoS One*, **7**(8), e44283.
- [97] Satroutdinov, A. D., Kuriyama, H., & Kobayashi, H. 1992. Oscillatory metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in continuous culture. *FEMS Microbiol Lett*, **77**(1-3), 261–267.
- [98] Sauer, Uwe. 2006. Metabolic networks in motion: ¹³C-based flux analysis. *Mol Syst Biol*, **2**, 62.
- [99] Schuster, S., Dandekar, T., & Fell, D. A. 1999. Detection of elementary flux modes in biochemical networks: a promising tool for pathway analysis and metabolic engineering. *Trends Biotechnol*, **17**(2), 53–60.
- [100] Segrè, Daniel, Vitkup, Dennis, & Church, George M. 2002. Analysis of optimality in natural and perturbed metabolic networks. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(23), 15112–15117.
- [101] Shirahama, K., Yazaki, Y., Sakano, K., Wada, Y., & Ohsumi, Y. 1996. Vacuolar function in the phosphate homeostasis of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Cell Physiol*, **37**(8), 1090–1093.
- [102] Silljé, H. H., ter Schure, E. G., Rommens, A. J., Huls, P. G., Woldringh, C. L., Verkleij, A. J., Boonstra, J., & Verrips, C. T. 1997. Effects of different carbon fluxes on G1 phase duration, cyclin expression, and reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, **179**(21), 6560–6565.
- [103] Silljé, H. H., Paalman, J. W., ter Schure, E. G., Olsthoorn, S. Q., Verkleij, A. J., Boonstra, J., & Verrips, C. T. 1999. Function of trehalose and glycogen in cell cycle progression and cell viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, **181**(2), 396–400.

- [104] Silverman, Sanford J., Petti, Allegra A., Slavov, Nikolai, Parsons, Lance, Briehof, Ryan, Thiberge, Stephan Y., Zenklusen, Daniel, Gandhi, Saumil J., Larson, Daniel R., Singer, Robert H., & Botstein, David. 2010. Metabolic cycling in single yeast cells from unsynchronized steady-state populations limited on glucose or phosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**(15), 6946–6951.
- [105] Slavov, Nikolai, & Botstein, David. 2011. Coupling among growth rate response, metabolic cycle, and cell division cycle in yeast. *Mol Biol Cell*, **22**(12), 1997–2009.
- [106] Slavov, Nikolai, Macinskas, Joanna, Caudy, Amy, & Botstein, David. 2011. Metabolic cycling without cell division cycling in respiring yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**(47), 19090–19095.
- [107] Smith, Colin A., O’Maille, Grace, Want, Elizabeth J., Qin, Chuan, Trauger, Sunia A., Brandon, Theodore R., Custodio, Darlene E., Abagyan, Ruben, & Siuzdak, Gary. 2005. METLIN: a metabolite mass spectral database. *Ther Drug Monit*, **27**(6), 747–751.
- [108] Sonnleitner, B., & Käppeli, O. 1986. Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by its limited respiratory capacity: Formulation and verification of a hypothesis. *Biotechnol Bioeng*, **28**(6), 927–937.
- [109] Sonnleitner, Bernhard, & Hahnemann, Ulrike. 1994. Dynamics of the respiratory bottleneck of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*, **38**(1), 63–79.
- [110] Soyer, O. S., & Pfeiffer, T. 2010. Evolution under fluctuating environments explains observed robustness in metabolic networks. *PLoS Comput Biol*, **6**(8).
- [111] Spellman, P. T., Sherlock, G., Zhang, M. Q., Iyer, V. R., Anders, K., Eisen, M. B., Brown, P. O., Botstein, D., & Futcher, B. 1998. Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol Biol Cell*, **9**(12), 3273–3297.
- [112] Stephani, A., Nuño, J. C., & Heinrich, R. 1999. Optimal stoichiometric designs of ATP-producing systems as determined by an evolutionary algorithm. *J Theor Biol*, **199**(1), 45–61.
- [113] Strahl, Thomas, & Thorner, Jeremy. 2007. Synthesis and function of membrane phosphoinositides in budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, **1771**(3), 353–404.
- [114] Strässle, C., Sonnleitner, B., & Fiechter, A. 1988. A predictive model for the spontaneous synchronization of *Saccharomyces cerevisiae* grown in continuous culture. I. Concept. *Journal of Biotechnology*, **7**(4), 299 – 317.
- [115] Strässle, C., Sonnleitner, B., & Fiechter, A. 1989. A predictive model for the spontaneous synchronization of *Saccharomyces cerevisiae* grown in continuous culture. II. Experimental verification. *Journal of Biotechnology*, **9**(3), 191 – 208.

LITERATURVERZEICHNIS

- [116] Tsurugi, Kunio. 2007. Energy-Metabolism Oscillation in the Living Organisms with Circadian Rhythms. *Yamanashi Medical Journal*, **22(3)**, 39–57.
- [117] Tu, Benjamin P., Kudlicki, Andrzej, Rowicka, Maga, & McKnight, Steven L. 2005. Logic of the yeast metabolic cycle: temporal compartmentalization of cellular processes. *Science*, **310**(5751), 1152–1158.
- [118] Tyson, John J., & Novak, Bela. 2008. Temporal organization of the cell cycle. *Curr Biol*, **18**(17), R759–R768.
- [119] Van Doorn, J., Valkenburg, J. A., Scholte, M. E., Oehlen, L. J., Van Driel, R., Postma, P. W., Nanninga, N., & Van Dam, K. 1988. Changes in activities of several enzymes involved in carbohydrate metabolism during the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, **170**(10), 4808–4815.
- [120] van Meer, Gerrit, Voelker, Dennis R., & Feigenson, Gerald W. 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**(2), 112–124.
- [121] Vemuri, G. N., Eiteman, M. A., McEwen, J. E., Olsson, L., & Nielsen, J. 2007. Increasing NADH oxidation reduces overflow metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**(7), 2402–2407.
- [122] Vermeulen, Katrien, Van Bockstaele, Dirk R., & Berneman, Zwi N. 2003. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif*, **36**(3), 131–149.
- [123] Wang, Jue D., & Levin, Petra A. 2009. Metabolism, cell growth and the bacterial cell cycle. *Nat Rev Microbiol*, **7**(11), 822–827.
- [124] Wang, P. J., Chabes, A., Casagrande, R., Tian, X. C., Thelander, L., & Huffaker, T. C. 1997. Rnr4p, a novel ribonucleotide reductase small-subunit protein. *Mol Cell Biol*, **17**(10), 6114–6121.
- [125] Weiss, J. N. 1997. The Hill equation revisited: uses and misuses. *FASEB J*, **11**(11), 835–841.
- [126] Whitfield, Michael L., Sherlock, Gavin, Saldanha, Alok J., Murray, John I., Ball, Catherine A., Alexander, Karen E., Matese, John C., Perou, Charles M., Hurt, Myra M., Brown, Patrick O., & Botstein, David. 2002. Identification of genes periodically expressed in the human cell cycle and their expression in tumors. *Mol Biol Cell*, **13**(6), 1977–2000.
- [127] Wittmann, Christoph, Hans, Michael, van Winden, Wouter A., Ras, Cor, & Heijnen, Joseph J. 2005. Dynamics of intracellular metabolites of glycolysis and TCA cycle during cell-cycle-related oscillation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng*, **89**(7), 839–847.

- [128] Wong, Chi-Ming, Siu, Kam-Leung, & Jin, Dong-Yan. 2004. Peroxiredoxin-null yeast cells are hypersensitive to oxidative stress and are genomically unstable. *J Biol Chem*, **279**(22), 23207–23213.
- [129] Wu, L., Lange, H. C., Van Gulik, W. M., & Heijnen, J. J. 2003. Determination of in vivo oxygen uptake and carbon dioxide evolution rates from off-gas measurements under highly dynamic conditions. *Biotechnol Bioeng*, **81**(4), 448–458.
- [130] Xie, Lulu, Kang, Hongyi, Xu, Qiwu, Chen, Michael J., Liao, Yonghong, Thiagarajan, Meenakshisundaram, O'Donnell, John, Christensen, Daniel J., Nicholson, Charles, Iliff, Jeffrey J., Takano, Takahiro, Deane, Rashid, & Nedergaard, Maiken. 2013. Sleep drives metabolite clearance from the adult brain. *Science*, **342**(6156), 373–377.
- [131] Xu, Zhaojun, & Tsurugi, Kunio. 2006. A potential mechanism of energy-metabolism oscillation in an aerobic chemostat culture of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS J*, **273**(8), 1696–1709.
- [132] Yin, D. 2000. Is carbonyl detoxification an important anti-aging process during sleep? *Med Hypotheses*, **54**(4), 519–522.
- [133] Zamboni, Nicola, & Sauer, Uwe. 2009. Novel biological insights through metabolomics and ¹³C-flux analysis. *Curr Opin Microbiol*, **12**(5), 553–558.
- [134] Zhuang, Kai, Vemuri, Goutham N., & Mahadevan, Radhakrishnan. 2011. Economics of membrane occupancy and respiro-fermentation. *Mol Syst Biol*, **7**, 500.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Visualisierung der respiratorischen Oszillation	2
2.1	Darstellung des experimentellen Systems.	10
2.2	Übersicht über das ^{13}C -Flussexperiment dargestellt an gelösten Sauerstoff in der Kultur.	12
2.3	Zeitreihen der monoisotopische Masse und des ersten Isotopologs	14
2.4	Schematische Darstellung des Methylocitratzyklus und dessen Verbindung zum Citratzyklus	15
2.5	Intensitätsprofile der Oszillatoren mit hohem Signal-zu-Rausch-Verhältnis	18
3.1	Schema des Minimalsystems, das zur Untersuchung von Szenario drei verwendet wird	25
3.2	Zeitreihen für eine der Lösungen, die mittels <i>in-silico</i> Evolution erzielt wird	27
3.3	Vergleich der Flüsse, die die Biomassekomponenten C und D produzieren	29
3.4	Die zwei qualitativen Lösungen der <i>in-silico</i> Evolution hier dargestellt für die Biomassekomponente C	30
3.5	Das Schema des zweiten Systems	34
3.6	Visualisierung der Regulationsstrukturen für eine der über <i>in-silico</i> Evolution bestimmten Lösungen	35
3.7	Zeitreihen für eine der evolvierten Lösungen des Minimalsystems	36
3.8	Das Schema des untersuchten Systems	38
3.9	Die zwei Strategien der Zelle dargestellt an v_4	39
3.10	Modell des zentralen Hefestoffwechsels	43
4.1	Schema eines Beispielsystems	46
4.2	Die gemessenen Konzentrationen im Abgas und deren Phasenbeziehung zum gelösten Sauerstoff im Medium	50
4.3	Die modifizierten Zeitverläufe der Konzentration im Abgas	51
4.4	Die gemessenen Konzentration im Abgas und deren Phasenbeziehung zum gelösten Sauerstoff im Medium	51
4.5	Austauschraten und deren Phasenbeziehung zum gelösten Sauerstoff im Medium	52
4.6	Phasenbeziehungen der Austauschraten zum gelösten Sauerstoff im Medium und der respiratorische Quotient	53
4.7	Optimale Wachstumsrate und der damit einhergehende Ethanolexport .	59
4.8	Die wesentlichen Stoffwechselwege, in denen NADH produziert und verbraucht wird	60

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

4.9	Maximale Wachstumsrate und die damit einhergehenden Austauschflüsse	61
4.10	Austauschraten in Abhängigkeit der Glucose- und Sauerstoffaufnahme- rate sowie der Kohlenstoffdioxidabgaberate	62
4.11	Akkumulationsraten der nicht bilanzierten Intermediate und die Wachs- tumsrate	63
4.12	Zwei Stoffwechselwege, in die Carbamoylphosphat involviert ist	65
4.13	Austausch- und interne Raten in Abhängigkeit der Glucoseaufnahme- rate, Sauerstoffaufnahme rate sowie der Kohlenstoffdioxidabgaberate . .	67
4.14	Die Flusslösungen, die sich bei der Maximierung der Wachstumsrate ergeben.	69
4.15	Optimierung der Produktionsraten für <i>ATP</i> und <i>NADPH</i> bei festge- setzten Raten für die Glucoseaufnahme, Sauerstoffaufnahme und Koh- lenstoffdioxidabgaberate	71
4.16	Optimierung der Produktionsraten für <i>ATP</i> und der für <i>NADPH</i> bei beschränkter Sauerstoffaufnahme rate	72
4.17	Optimierung der Produktionsraten für <i>ATP</i> und der für <i>NADPH</i> bei beschränkter Kohlenstoffdioxidproduktionsrate	73
4.18	Optimierung der Produktionsraten von <i>ATP</i> in Abhängigkeit des ba- salen Verbrauchs von <i>NADPH</i>	76
4.19	Die optimalen Produktionsraten von Aspartat und Glutamin in Abhän- gigkeit der Austauschraten.	81
4.20	Die optimalen Produktionsraten von Triglyceriden und Methionin in Abhängigkeit der Austauschraten	82
4.21	Die optimalen Produktionsraten von UMP und dGMP in Abhängigkeit der Austauschraten	83
4.22	Die Raten der ersten Reaktion des Pentose-Phosphat-Weges und einer Rate im Citratzyklus	84
4.23	Zeitliche Abfolge der optimalen Produktionsraten der Biomassekompo- nenten über den Zyklus	85
B.1	Die evolvierten Lösungen für das Minimalsystem dargestellt in Abbil- dung 3.1.	103
C.1	Die optimalen Produktionsraten von Arginin, Asparagin, Cystein und Isoleucin in Abhängigkeit der Austauschraten	116
C.2	Die optimalen Produktionsraten von AMP, CMP, dTMP und dCMP in Abhängigkeit der Austauschraten	117
C.3	Die optimalen Produktionsraten von Ergosterol, Pa, Pc und Pe in Ab- hängigkeit der Austauschraten	118

Tabellenverzeichnis

3.1 Die evolvierten Regulationsstrukturen und die daraus resultierende Biomasseproduktion	30
3.2 Die evolvierten Regulationsstrukturen und die daraus resultierende Biomasseproduktion	37
3.3 Parameter und Flusswerte, die verwendet werden, um die beiden Strategien hinsichtlich ihres Enzymbedarfs zu untersuchen	40
3.4 Die optimalen Konzentrationen der Intermediate für beide untersuchte Strategien	40
3.5 Die benötigte Menge an Enzymen für beide untersuchte Strategien . . .	40
4.1 Die über FBA berechneten Austausch- und Wachstumsraten	57
4.2 Raten der virtuellen Transporter	78
4.3 Die drei höchsten und drei niedrigsten Produktionsraten	80

Danksagung

Ich möchte mich insbesondere bei meinem Betreuer **Hanspeter Herzel** bedanken. Für seine fachliche Expertise, von der ich bereits während meines Studiums profitieren konnte, die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe zunächst als HiWi arbeiten und anschließend meine Doktorarbeit anfertigen zu können, für die sehr gute Betreuung während all dieser Zeit. Mein besonderer Dank gilt auch **Ralf Steuer**, für dessen sehr gute fachliche Betreuung, für die Hilfestellung, die mir während unserer Zusammenarbeit zuteil wurde. I am very grateful to **Douglas Murray** who was an excellent host during my three stays in Tsuruoka, a great teacher who had confidence in my abilities, who gave me this outstanding opportunity to carry out experiments in his lab. **Kalesh Sasidharan** made me familiar with all the techniques required for the experimental part of this work, thanks a lot for that, for all your patience and also for taking me to the “cheese and chicken”-place where we have been to several times! I also thank **Cornelia Amariei** for helping me out whenever I experienced problems with R, for a lot of wonderful discussion. Bedanken möchte ich mich bei allen Verantwortlichen des Graduiertenkollegs, insbesondere bei **Edda Klipp**, **Uta Kaufhold** und **Cordelia Arndt-Sullivan**, für die Möglichkeit meine Doktorarbeit unter diesen Rahmenbedingungen anfertigen zu können, für die hervorragende Organisation, die Unterstützung bei allen administrativen Angelegenheiten und die Möglichkeit insgesamt 8 Monate in Japan experimentell tätig zu sein. Ich danke auch **Sabrina Hoffmann**, die mich in die Software FASIMU einwies, stets für Diskussionen über die damit erzielten Ergebnisse bereitstand. Herzlich danken möchte ich auch **Rainer Machné**, für die zahlreichen Diskussionen und Anregungen, das ausführliche Beantworten von unzähligen biologischen Fragen. Ich danke **Oliver Ebenhöh**, dafür, dass er mir bereits in einem sehr frühen Stadium meiner Ausbildung ermöglichte, in der akademischen Forschung tätig zu sein, was meine weitere Laufbahn maßgeblich bestimmte. Mein Dank gilt auch **Andreas Hantschmann**, **Elvira Lauterbach**, **Tiziano Zito** und **Karin Winklhofer** am ITB für das Lösen von Computerproblemen und die Hilfe bei administrativen Angelegenheiten. Meinen Zimmernachbarn **Grigory Bordyugov** und **Bharath Ananthasubramaniam** danke ich für viele belebende Diskussionen und eine stets sehr angenehme Arbeitsatmosphäre am ITB.

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Berlin, den 28.04.2014

Willi Gottstein